

**Caracterización de cepas de origen aviar de  
*Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de  
espectro extendido y del grupo clonal de alto riesgo  
ST131**

**Verónica Gómez Gómez**  
**Tesis Doctoral**  
**2017**



**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE ORIGEN AVIAR DE  
*Escherichia coli* PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS DE  
ESPECTRO EXTENDIDO Y DEL GRUPO CLONAL DE ALTO  
RIESGO ST131**

**Verónica Gómez Gómez**

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA  
LABORATORIO DE REFERENCIA DE *ESCHERICHIA COLI*  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOXÍA E PARASITOLOXÍA  
FACULTADE DE VETERINARIA  
LUGO, 2017**







## AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

D. Jorge Blanco Álvarez.

Catedrático del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Dña. Azucena Mora Gutiérrez.

Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología e Parasitología de la USC.

Como Directores de la Tesis Doctoral titulada “CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE ORIGEN AVIAR DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE  $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO Y DEL GRUPO CLONAL DE ALTO RIESGO ST131”

Presentada por Dña. VERÓNICA GÓMEZ GÓMEZ.

Alumna del Programa de Doctorado: Microbiología e Parasitología.

Autorizan la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, y que como Directores de la misma no incurrir en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

Lugo, 20 de Febrero de 2017

Fdo. Azucena Mora

Fdo. Jorge Blanco

## Sinatura dixital / Firma digital / Digital signature

Asinante/Firmante/Signer: AZUCENA DEL CARMEN MORA GUTIÉRREZ, NIF 32801273F, 22/02/2017 16:47:56.

CSV: 35F9-7559-419D-AB5F

**Esta tesis ha sido financiada por:**

Este estudio ha sido financiado por el proyecto nacional AGL2013-47852-R (Ministerio de Economía y Competitividad, Gobierno de España), y por los proyectos EM2014/001 y 10MRU261023PR y el programa de Consolidación y Estructuración de Unidades de Investigación Competitivas CN2012/303 (Consellería de Economía e Industria y Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia y el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional).







## AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años son muchas las personas que han colaborado en este estudio a los quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

**A Azucena Mora y Jorge Blanco**, por la dirección y coordinación de este estudio, por su comprensión, por sus enseñanzas tan importantes para mí y por su ayuda en la revisión crítica de esta memoria.

A mis compañeros del LREC-USC, **Cecilia López, Isidro Meniño, Susana Viso, Ghizlane Dahbi, Alexandra Herrera, Saskia Flament, Dafne Díaz, Jesús Blanco** gracias por vuestras enseñanzas y colaboración en los diferentes ensayos fenotípicos (serotipado) y genotípicos (PCR, MLST, PFGE) incluidos en esta tesis doctoral. Y sobre todo gracias por vuestra acogida durante todo este tiempo.

A **Vanesa García** gracias por los últimos estudios y resolver todas mis dudas.

A **Rosalía Mamani**, gracias por tu cariño y tu gran ayuda. Te echo de menos.

A **María Pilar Alonso, Amparo Coira, Julia María Pita Carretero y especialmente a Fernando García-Garrote**, (Unidad de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Lucus Augusti, HULA) por el aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli* obtenidas de pacientes con infecciones urinarias y bacteriemias.

A mis compañeros de Bacteriología del Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia, después de tantos años siempre es un placer ir a trabajar todos los días con vosotros. Con Antonio como maestro, Amada, Conchi, Luci, Bea, Clara, Laura y Ángeles, me sumergí en el fascinante mundo de la microbiología veterinaria.

A mis compañeros del Laboratorio y de la Delegación que entre caña y caña se han convertido en amigos Paula, Bea, Amada, Pili, Olga, Ana, Emilio, Raúl, Mercedes, Santi, Rifón, Álvaro, Jato, Antonio, Victor, Tere y Chiño.

A las familias Sánchez-Lamas y López-Rodríguez, gracias por vuestra acogida y cariño. Sin vosotros, mi estancia en Lugo no sería tan gratificante.

A Mónica y a mis niñas de Tragsega, vuestras cenas y bailes son un buen antídoto contra los agobios predoctorales.

A Jesús Díaz, Francisco P. Santiago y a Jose Luis Losada por estar siempre tan dispuestos a asesorarme en temas de avicultura y a Javier Diéguez por su ayuda en este mundo tan complejo de la estadística.

A mis amigos de siempre Alicia, Isma, Nuria, David, Lydia, Ruth, Souto, Sandra, Jose, Raquel, Celso, Marisol, Tareixa, JC, Jose, Noe, María, Manu y Juan, gracias por el gran apoyo durante estos últimos meses que he estado desaparecida.

A la familia, la que está cerca, lejos y muy lejos. A los que se han ido....echo mucho de menos conversar con vosotros. Y en especial a mi madre.

A Ignacio, mi compañero de ilusiones y proyectos. Gracias por tu apoyo y dedicación. Te quiero.

A mi niña, Valentina, la sonrisa de casa, gracias por tus abrazos de oso y tus besos. A partir de ahora siempre tendré un rato para jugar contigo a los bebés. Te lo prometo.

THE BRITISH JOURNAL  
OF  
EXPERIMENTAL  
PATHOLOGY  
VOLUME TEN  
1929

*Reproduced from pages 226–236.*

ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A  
PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR  
USE IN THE ISOLATION OF *B. INFLUENZÆ*.

ALEXANDER FLEMING, F.R.C.S.

*From the Laboratories of the Inoculation Department, St Mary's Hospital, London.*

Received for publication May 10th, 1929.

WHILE working with staphylococcus variants a number of culture-plates were set aside on the laboratory bench and examined from time to time. In the examinations these plates were necessarily exposed to the air and they became contaminated with various micro-organisms. It was noticed that around a large colony of a contaminating mould the staphylococcus colonies became transparent and were obviously undergoing lysis (see Fig. 1).

Subcultures of this mould were made and experiments conducted with a view to ascertaining something of the properties of the bacteriolytic substance which had evidently been formed in the mould culture and which had diffused into the surrounding medium. It was found that broth in which the mould had been grown at room temperature for one or two weeks had acquired marked inhibitory, bactericidal and bacteriolytic properties to many of the more common pathogenic bacteria.

CHARACTERS OF THE MOULD.

The colony appears as a white fluffy mass which rapidly increases in size and after a few days sporulates, the centre becoming dark green and later in old cultures darkens to almost black. In four or five days a bright yellow colour is produced which diffuses into the medium. In certain conditions a reddish colour can be observed in the growth.

But I would like to sound one note of warning. Penicillin is to all intents and purposes non-poisonous so there is no need to worry about giving an overdose and poisoning the patient. There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant.

Alexander Flemming  
1945



<b>ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 Características generales de Escherichia coli.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 Clasificación serológica de E. coli.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3 Patotipos de E. coli.....</b>	<b>15</b>
1.3.1 E. coli diarreagénicos .....	16
1.3.2 E. coli patógenos extraintestinales (ExPEC).....	18
<b>1.4 Antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos y <math>\beta</math>-lactamasas .....</b>	<b>32</b>
1.4.1 $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	36
1.4.2 Expansión de BLEE en animales de producción y de compañía .....	39
1.4.3 Expansión de BLEE en la fauna silvestre .....	44
<b>1.5 Grupo clonal ST131 .....</b>	<b>49</b>
1.5.1 Escherichia coli ST131 en animales de compañía .....	52
1.5.2 Escherichia coli ST131 en animales de producción.....	53
1.5.3 Escherichia coli ST131 en fauna silvestre.....	54
<b>1.6 Resistencias a los antibióticos. Un problema de salud pública .....</b>	<b>55</b>
<b>1.7 El sector avícola en España.....</b>	<b>63</b>
1.7.1 Organización general del sector avícola .....	63
1.7.2 Datos de producción del sector avícola en España .....	66
1.7.3 El sector avícola en Galicia.....	67
1.7.4 Plan sanitario avícola.....	68
<b>1.8 Uso de antimicrobianos en producción animal .....</b>	<b>71</b>



1.8.1	Alternativas al uso de antimicrobianos en la producción avícola .....	84
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>95</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>97</b>
3.1	Características de las granjas muestreadas .....	97
3.2	Recogida de muestras .....	100
3.3	Cepas control y conservación de las cepas .....	104
3.4	Aislamiento de E. coli.....	105
3.5	Métodos Genotípicos.....	106
3.5.1	PCR para genes de enzimas BLEE, de virulencia y del antígeno O25b .....	106
3.5.2	Determinación de los grupos filogenéticos .....	111
3.5.3	Clonotipado .....	113
3.5.4	Multilocus Sequence Typing (MLST).....	113
3.5.5	Secuenciación de genes .....	115
3.5.6	Pulsotipos obtenidos por electroforesis en campo pulsado (PFGE) .....	115
3.6	Métodos fenotípicos .....	119
3.6.1	Biotipado y sensibilidad antimicrobiana.....	119
3.6.2	Serotipado.....	123
3.7	Tratamiento estadístico .....	128
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>129</b>
4.1	E. coli productores de BLEE .....	142
4.1.1	Prevalencia .....	142
4.1.2	Tipado de enzimas BLEE.....	149
4.1.3	Resistencias fenotípicas.....	152
4.1.4	Serotipos.....	162
4.1.5	Genes de virulencia .....	168
4.1.6	Grupos filogenéticos .....	175
4.1.7	Clonotipos y secuencias tipo.....	185

4.1.8	Árbol filogenético basado en las secuencias tipo. ....	197
4.1.9	Comparación entre E. coli BLEE aviare y humanos .....	199
<b>4.2</b>	<b>Grupo clonal ST131 .....</b>	<b>217</b>
4.2.1	Prevalencia.....	217
4.2.2	Patrones de resistencias y $\beta$ -lactamasas .....	218
4.2.3	Genes de virulencia .....	219
4.2.4	Clonotipos y virotipos: Comparación entre cepas aviare y humanas .....	221
4.2.5	Perfiles de macrorrestricción.....	225
<b>4.3</b>	<b>Comparación con estudios de otros países .....</b>	<b>229</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>235</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>237</b>
6.1	Bibliografía general.....	237
6.2	Bibliografía de legislación y otros documentos .....	262



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>6-APA</b>	Ácido 6-aminopenicilánico	<b>DEC</b>	Del inglés “ <i>Diarreheagenic Escherichia coli</i> ”
<b>7-ACA</b>	Ácido 7 aminocefalosporánico	<b>EAEC</b>	Del inglés “ <i>Enteraggregative Escherichia coli</i> ”
<b>AC</b>	Autorización de comercialización	<b>ECDC</b>	Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético,
<b>ADSG</b>	Agrupación de Defensa Sanitaria Ganadera	<b>EEMM</b>	Estados Miembros
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	<b>EEUU</b>	Estados Unidos de América
<b>AM</b>	Ampicilina	<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>AMC</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico	<b>EHEC</b>	Del inglés “ <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i> ”
<b>AN</b>	Amikacina	<b>EIEC</b>	Del inglés “ <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i> ”
<b>APEC</b>	Del inglés “ <i>Avian pathogenic E. coli</i> ”	<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control	<b>EPEC</b>	Del inglés “ <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i> ”
<b>ATM</b>	Aztreonam	<b>ESBL</b>	Del inglés “ <i>Extended Spectrum <math>\beta</math>-lactamase</i> ”
<b>BD</b>	Becton Dickinson	<b>ESVAC</b>	<i>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</i>
<b>BLEE</b>	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido	<b>ETA</b>	Enfermedades transmitidas por alimentos
<b>C</b>	Colistina	<b>ETEC</b>	Del inglés “ <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> ”
<b>CAZ</b>	Ceftazidima	<b>ETP</b>	Ertapenem
<b>CCAA</b>	Comunidades Autónomas	<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>CDC</b>	Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta	<b>ExPEC</b>	Del inglés “ <i>Extra-intestinal Pathogenic Escherichia coli</i> ”
<b>CEE</b>	Comunidad Económica Europea	<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>CFZ</b>	Cefazolina	<b>FDA</b>	United States Food and Drug Administration
<b>CH</b>	Colitis Hemorrágica/Clonotipado	<b>FEP</b>	Cefepime
<b>CIP</b>	Ciprofloxacino	<b>FF</b>	Fosfomicina
<b>CL</b>	Colistina	<b>FOX</b>	Cefoxitina
<b>ClNa</b>	Cloruro sódico	<b>GM</b>	Gentamicina
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	<b>HNM</b>	Antígeno H no móvil
<b>CMI</b>	Concentración Mínima Inhibitoria	<b>HNT</b>	Antígeno H no tipable
<b>CTX</b>	Cefotaximo	<b>HULA</b>	Hospital Universitario Lucas Augusti
<b>CTX-M</b>	Cefotaximasas	<b>ibeA</b>	Del inglés “ <i>invasión of brain endothelium</i> ”
<b>DAEC</b>	Del inglés “ <i>Diffusely Adherent Escherichia coli</i> ”		

<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>iss</b>	Del inglés “increased serum survival”
<b>ITU</b>	Infección del tracto urinario
<b>LASAPAGA</b>	Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LREC-USC</b>	Laboratorio de Referencia de Escherichia coli-Universidad de Santiago de Compostela
<b>LVX</b>	Levofloxacin
<b>MACL</b>	MacConkey Lactosa
<b>MAGRAMA</b>	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
<b>MDR</b>	Del inglés “Multidrug-resistant”
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MLST</b>	Del inglés “Multilocus Sequence Typing”
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>NMEC</b>	Del inglés “Neonatal meningitis associated E. coli”
<b>NN</b>	Tobramicina
<b>NR</b>	No realizado
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>ompT</b>	Del inglés “outer membrane protein T”
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONT</b>	Antígeno O no tipable
<b>PAI</b>	Del inglés “Pathogenicity islands”
<b>PCR</b>	Del inglés “Polymerase Chain Reaction”
<b>PCU</b>	Unidad de corrección de la población
<b>PDR</b>	Del inglés “Pandrug-resistant”
<b>PFGE</b>	Del inglés “Pulsed Field Gel Electrophoresis”
<b>PIP</b>	Piperacilina
<b>PRAN</b>	Plan Nacional de Resistencia a Antibióticos
<b>RAM</b>	Resistencia a los Antimicrobianos.
<b>RCP</b>	Resumen de las características del producto
<b>RD</b>	Real Decreto
<b>sat</b>	Del inglés “secreted autotransporter toxin”
<b>SEPEC</b>	Del inglés “Septicemic Escherichia coli”

<b>SNP</b>	Del inglés “Single Nucleotide Polymorphism”
<b>ST</b>	Secuencia tipo
<b>STEC</b>	Del inglés “Shiga-toxin Escherichia coli”
<b>SUH</b>	Síndrome urémico hemolítico
<b>SXT</b>	Trimetropim/sulfametoxazol
<b>TATFAR</b>	Transatlantic Taskforce on Antimicrobial Resistance
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>Th2</b>	Linfocitos T Helper 2
<b>TSA</b>	Triptona Soja agar
<b>tsh</b>	Del inglés “temperatura sensitive hemagglutinin”
<b>TZP</b>	Piperacilina/tazobactam
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UPEC</b>	Del inglés “Uropathogenic Escherichia coli”
<b>UPGMA</b>	Del inglés “Unweighted Pair Group Method using arithmetic averages”
<b>USA</b>	United States of America
<b>USC</b>	Universidad de Santiago de Compostela
<b>usp</b>	Del inglés “uropathogenic strain-specific protein”
<b>vs.</b>	Versus
<b>VTEC</b>	Del inglés “Verotoxigenic Escherichia coli”
<b>XDR</b>	Del inglés “Extensively drug-resistant”



## RESUMEN

El problema de la resistencia a los antibióticos, es una de las principales amenazas para la salud pública, causando un gran impacto clínico, epidemiológico y microbiológico a nivel mundial. Por este motivo, es de gran interés conocer el potencial patógeno zoonótico de las cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal de alto riesgo O25b:H4-B2-ST131 en la producción avícola intensiva.

En el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos:

1. Conocer la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE del tipo CTX-M y SHV, y de cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, así como otros posibles grupos clonales emergentes en muestras de heces y ambientales de granjas avícolas.
2. Conocer el potencial patógeno de las cepas aviares aisladas mediante la determinación de sus perfiles de virulencia y las resistencias a antibióticos.
3. Conocer el potencial zoonótico de las cepas aviares mediante la determinación del grado de clonalidad de las mismas con respecto de aislados clínicos humanos causantes de infecciones extraintestinales.
4. Conocer el grado de diseminación actual de las cepas aviares desde la granja al consumidor a través de comparación con cepas aisladas de alimentos de origen aviar.

De los resultados obtenidos se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. En las explotaciones avícolas de Galicia hay una prevalencia elevada de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, siendo especialmente prevalentes en las explotaciones de broilers.

2. La mayoría de las cepas aviarias fecales producen las enzimas CTX-M-1, CTXM-14 y SHV-12.
3. Las cepas aviarias productoras de BLEE son multirresistentes y casi la mitad son resistentes a las quinolonas fluoradas.
4. Existe una enorme diversidad genética entre las cepas aviarias productoras de BLEE, ya que pertenecen a una amplísima variedad de serotipos, clonotipos y secuencias tipo.
5. Aunque las cepas aviarias productoras de BLEE pueden pertenecer a los siete grupos filogenéticos reconocidos, más de la mitad se engloban en el A y en el B1.
6. Un porcentaje significativo de las cepas aviarias fecales productoras de BLEE presentan clonotipos, secuencias tipo y perfiles de genes de virulencia similares a los encontrados en cepas productoras de BLEE causantes de bacteriemias en seres humanos.
7. Las aves son un reservorio de cepas del subclón CH40-22 y del virotipo D4 del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Además, algunas cepas aviarias de este suclón son muy similares a las cepas de dicho subclón causantes de infecciones extraintestinales (bacteriemias e ITUs) en seres humanos.
8. En contraste las aves no son un reservorio del subclón CH40-30 que es el más exitoso y expandido entre las cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos a nivel mundial.
9. Muchas de las cepas fecales aviarias de *E. coli* productoras de BLEE poseen genes de virulencia que le permiten ser clasificadas con el estatus APEC y por tanto ser potencialmente patógenas para aves.

10. Los resultados encontrados en las explotaciones avícolas gallegas son similares a los encontrados en otros países europeos y en otros continentes, aunque se observan notables diferencias entre los diferentes estudios realizados.





## RESUMO

O problema da resistencia ós antibióticos é unha das principais ameazas para a saúde pública, causando un gran impacto clínico, epidemiolóxico e microbiolóxico a nivel mundial. Por este motivo, é de gran interese coñecer o potencial patóxico zoonótico das cepas de *E. coli* produtoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro estendido (BLEE) e do grupo clonal de alto risco O25b:H4-B2-ST131 na produción avícola intensiva.

No presente estudo propuxéronse os seguintes obxectivos:

1. Coñecer a prevalencia das cepas de *E. coli* produtoras de BLEE do tipo CTX-M e SHV, e de cepas de *E. coli* pertencentes ó grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, así como outros posibles grupos clonais emerxentes, nas mostras de feces e ambientais das granxas avícolas.
2. Coñecer o potencial patóxico das cepas aviarias illadas mediante a determinación dos seus perfís de virulencia e as resistencias ós antibióticos.
3. Coñecer o potencial zoonótico das cepas aviarias mediante a determinación do seu grao de clonalidade con respecto ós illados clínicos humanos causantes de infeccións extraintestinais.
4. Coñecer o grao de diseminación actual das cepas aviarias dende a granxa ata o consumidor mediante a comparación con cepas illadas de alimentos de orixe aviar.

Dos resultados obtidos achegamos as seguintes conclusións:

1. Nas explotacións avícolas de Galicia hai unha prevalencia elevada de cepas de *E. coli* produtoras de BLEE, sendo especialmente prevalentes nas explotacións de broilers.



2. A maioría das cepas aviarias fecais producen as enzimas CTX-M-1, CTXM-14 e SHV-12.
3. As cepas aviarias produtoras de BLEE son multirresistentes e case a metade son resistentes ás quinolonas fluoradas.
4. Existe unha enorme diversidade xenética entre as cepas aviarias produtoras de BLEE, xa que pertencen a unha amplísima variedade de serotipos, clonotipos e secuencias tipo.
5. Aínda que as cepas aviarias produtoras de BLEE poidan pertencer ós sete grupos filoxenéticos reconecidos, máis da metade englobáanse no A e no B1.
6. Unha porcentaxe significativa das cepas aviarias fecais produtoras de BLEE presentan clonotipos, secuencias tipo e perfís de xenes de virulencia similares ós atopados en cepas produtoras de BLEE causantes de bacteriemias nos seres humanos.
7. As aves son un reservorio de cepas do subclón CH40-22 e do virotipo D4 do grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Ademais, algunhas cepas aviarias deste subclón son moi similares ás cepas de dito subclón causantes de infeccións extraintestinais (bacteriemias e ITUs) nos seres humanos.
8. En contraste as aves non son un reservorio do subclón CH40-30 que é o máis exitoso e expandido entre as cepas causantes de infeccións extraintestinais en seres humanos a nivel mundial.
9. Moitas das cepas fecais aviarias de *E. coli* produtoras de BLEE posúen xenes de virulencia que lles permiten ser clasificadas co estatus APEC e por tanto ser potencialmente patóxenas para as aves.

10. Os resultados atopados nas explotacións avícolas galegas son similares ós achados noutros países europeos e continentes, aínda que se observan notables diferenzas entre os diferentes estudos realizados.





## SUMMARY

The problem of antibiotic resistance is one of the main threats to public health, causing a major clinical, epidemiological and microbiological impact worldwide. For this reason, it is of great interest to know the pathogenic zoonotic potential of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* strains and of the high risk clonal group O25b:H4-B2-ST131 in intensive poultry production.

In the present study the following objectives have been proposed:

1. To assess the prevalence of ESBL-producing *E. coli* strains of CTX-M and SHV types, and of *E. coli* strains belonging to the clonal group O25b: H4-B2-ST131, as well as other possible emerging clonal groups from faeces and environmental samples of poultry farms.
2. To establish the pathogenic potential of isolated avian strains by determining their virulence profiles and resistance to antibiotics.
3. To study the zoonotic potential of the avian strains by determining the level of clonality of isolated strains by comparing them to human clinical strains causing extraintestinal infections.
4. To know the current level of dissemination of the avian strains from the farm to the consumer by comparing them to strains isolated from food of avian origin.

According to the obtained results, it is concluded:

1. There is a high prevalence of ESBL producing *E. coli* strains, in poultry farms in Galicia, being especially prevalent in broiler chicken farms.
2. Most of faecal avian strains produce CTX-M-1, CTXM-14 and SHV-12 enzymes.

3. ESBL-producing avian strains are multidrug resistant and nearly half of them are resistant to fluoroquinolones.
4. There is an enormous genetic diversity among the ESBL-producing avian strains, since they belong to a very wide variety of serotypes, clonotypes and sequence types.
5. Although the ESBL-producing avian strains may belong to the seven recognized phylogenetic groups, more than half are included in A and B1 groups.
6. A significant percentage of the ESBL-producing faecal avian strains present clonotypes, sequence types and virulence gene profiles similar to those found in ESBL-producing strains that cause bacteraemia in humans.
7. Poultry are a reservoir of strains of subclone CH40-22 and virotype D4 of clonal group O25b: H4-B2-ST131. In addition, some avian strains of this subclone are very similar to the strains of this subclone that cause extraintestinal infections (bacteraemia and UTIs) in humans.
8. In contrast, poultry are not a reservoir of the CH40-30 subclone that is the most successful and widespread among the strains that cause extraintestinal infections in humans worldwide.
9. Many of the ESBL-producing *E. coli* avian faecal strains possess virulence genes that allow them to be designated as APEC status and therefore be potentially pathogenic to poultry.
10. The results found in the Galician poultry farms are similar to those found in other European countries and other continents, although notable differences have been detected among the different studies performed.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Características generales de Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*) fue descrito por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich tras aislarlo de las heces de un niño sano, bautizándolo inicialmente con el nombre de *Bacterium coli* (Escherich, 1885).

*E. coli* es un bacilo gram-negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Ewing, 1986; Blanco *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Beutin, 2006; Bettelheim, 2007). Seguramente sea el organismo procariota más estudiado debido a su facilidad de crecimiento (una división celular cada 20 minutos a 37°C en un medio nutritivo), a su temprano descubrimiento, a su importante significado clínico y a su gran diversidad genética, lo que ha hecho de esta bacteria el candidato ideal para los experimentos de genética y biología molecular.

Forma parte de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa comensal del tubo digestivo de la mayor parte de los mamíferos (Hartl & Dykhuizen, 1984; Gordon & Cowling, 2003), colonizando el tracto gastrointestinal del neonato a las pocas horas de vida. Junto con el resto de bacterias presentes en el intestino, *E. coli* realiza diferentes funciones de carácter fisiológico beneficiosas para el hospedador, tales como el aporte de nutrientes esenciales para el epitelio intestinal, su papel en la síntesis de las vitaminas K y B, el procesamiento de los residuos alimenticios, el constante estímulo de la respuesta inmune en el hospedador o la inhibición competitiva que ejerce sobre el crecimiento de todo tipo de enteropatógenos (Kruis, 2004).

Al tratarse de una bacteria intestinal, la más abundante de las bacterias anaerobias facultativas intestinales, *E. coli* se excreta diariamente con las heces de manera abundante y un alto porcentaje de los microorganismos sobreviven en el exterior, al menos inicialmente. Por ese motivo, es posible su presencia en el medio ambiente, ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y en los alimentos, siendo por ello su aislamiento un indicador de contaminación fecal reciente (Gordon & Cowling, 2003).

Si bien la mayor parte de los *E. coli* forman parte de la microbiota normal de los mamíferos donde juega un papel inocuo o incluso beneficioso para el hospedador, algunas cepas *E. coli* se consideran patógenas, debido a la adquisición de factores de virulencia específicos que les confieren la capacidad de producir una amplia variedad de infecciones de tipo entérico (diarreas, disentería, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y enfermedad de los edemas) o extraintestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares y de heridas). Así, según Russo & Johnson, 2000, las cepas de *E. coli* se clasifican en tres categorías: comensales, patógenas entéricas y patógenas extraintestinales, en función de su grado de patogenicidad y del tipo de infecciones que producen (Figura 1).



**Figura 1. Imagen de *Escherichia coli* al microscopio electrónico. Centro de Investigación Helmholtz.**

A pesar de los miles de estudios publicados todavía no son conocidos con detalle las bases moleculares de la patogenicidad de *E. coli* y su interacción con el hospedador (Mainil & Fairbrother, 2014).

## 1.2 *Clasificación serológica de E. coli*

Uno de los métodos utilizados para tipificar las cepas de *E. coli* fue desarrollado por Kauffman en 1947. Kauffman propuso un sistema basado en la determinación de los antígenos superficiales O (somáticos, de la membrana externa de la pared celular), K (capsulares) y H (flagelares). Esta forma de clasificación serológica resultó ser muy útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas patógenas e inoñas. En la actualidad se reconocen del orden de 176 antígenos O (O1 a O185), 72 antígenos K (K1 a K103) y 53 antígenos H (H1 a H56), y aunque existen numerosas combinaciones o serotipos O:K:H, tan solo algunas son frecuentes entre las cepas patógenas. La determinación de los antígenos O y H se realiza por técnicas de aglutinación, mientras que la identificación del antígeno K es recomendable que se realice por contrainmunolectroforesis. (Guinée *et al.*, 1981; Orskov & Orskov, 1984; Ewing, 1986).

## 1.3 *Patotipos de E. coli*

Las cepas patógenas de *E. coli* se pueden tipar atendiendo a sus antígenos superficiales (serotipo) y a sus genes de virulencia (patotipo). Así, el término seropatotipo hace referencia al conjunto del serotipo y los factores de virulencia que caracterizan a la cepa.

Las cepas patógenas de *E. coli* poseen diferentes tipos de factores de virulencia que suelen ser adquiridos por mecanismos de intercambio genético bacteriano y contribuyen conjuntamente a potenciar su patogenicidad; es por ello que la virulencia



bacteriana es un fenómeno multifactorial. Entre dichos factores de virulencia cabe destacar la capacidad de producir toxinas (toxigenicidad), la expresión de adhesinas que facilitan la adherencia a las superficies corporales (adhesividad), la facultad de invadir diferentes tejidos (invasividad), la resistencia al suero y a la fagocitosis, etc.

Las cepas de *E. coli* que causan infecciones en seres humanos y animales pueden compartir determinados factores de virulencia, pero en general presentan diferentes serotipos y poseen adhesinas específicas que son responsables de su especificidad de huésped. Por lo tanto, las cepas de *E. coli* patógenas para seres humanos no suelen producir infecciones en animales y viceversa. No obstante, se ha comprobado que los animales pueden ser un reservorio de *E. coli* enteropatógenos para las personas. Así, los *E. coli* verotoxigénicos (VTEC) que causan colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos, forman parte de la microbiota normal del ganado bovino y ovino donde se comportan, en la mayor parte de los casos, como comensales. También se ha comprobado que las aves pueden ser un reservorio de cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales para seres humanos.

En base a los factores de virulencia que poseen, a sus serotipos, a sus mecanismos de patogénesis y a las infecciones y síndromes que causan, los de *E. coli* se engloban en dos grandes categorías: *E. coli* diarreagénicos (DEC) y *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC).

### 1.3.1 *E. coli* diarreagénicos

*E. coli* provoca en seres humanos del orden de 1.731 millones de casos de diarrea en el mundo y aproximadamente 718.000 muertes al año, afectando fundamentalmente a la población infantil del tercer mundo (Walker *et al.*, 2013).

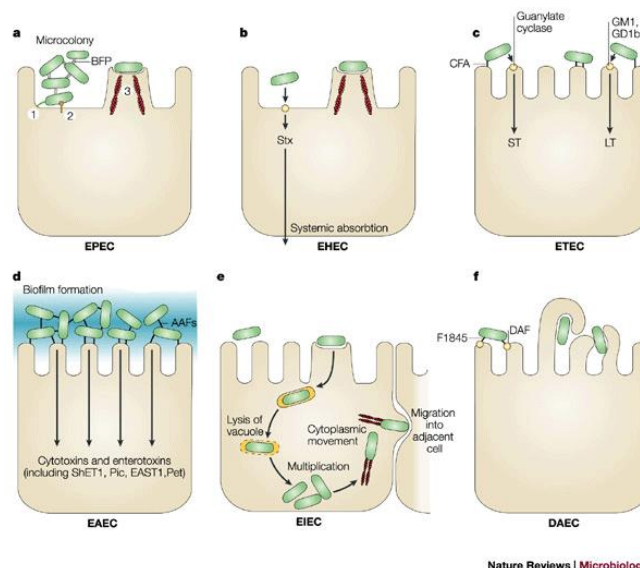
La prevalencia de los distintos patógenos entéricos varía entre los distintos países y áreas geográficas y en los últimos años han adquirido una gran relevancia en cuestión

de salud pública (Cohen *et al.*, 2005; Okeke, 2009; Estrada-García & Navarro-García, 2012; Croxen *et al.*, 2013; Dutta *et al.*, 2013; Chattaway *et al.*, 2013).

En animales domésticos las colibacilosis de origen entérico son muy frecuentes, afectando principalmente a animales de pocos días de edad y recién destetados, ocasionando importantes pérdidas económicas en las explotaciones de ganado bovino, porcino y ovino, así como en la cría intensiva de conejos (De Rycke *et al.*, 1990; Holland, 1990; Johnson, 1991; Blanco J *et al.*, 1992a; 1993; Blanco JE *et al.*, 1996; 2004; Blanco M *et al.*, 1993; 2004; Cid *et al.*, 1996; Nataro & Kaper, 1998; Dho & Fairbrother, 1999; Mora, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Mainil & Daube, 2005; Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007).

Los *E. coli* diarreagénicos se clasifican en seis categorías en función de sus características clínicas, epidemiológicas y factores de virulencia: *E. coli* enterotoxigénicos (ETEC), *E. coli* enteropatogénicos (EPEC), *E. coli* enteroinvasivos (EIEC), *E. coli* enteroagregativos (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* verotoxigénicos (VTEC) o enterohemorrágicos (EHEC) también conocidos como Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) (Nataro & Kaper, 1998) (Figura 2).

A diferencia de las cepas comensales y de las cepas ExPEC, las cepas de *E. coli* diarreagénicas raramente aparecen en la microbiota fecal de hospedadores sanos, además parecen ser esencialmente patógenas obligadas, causando distintas infecciones entéricas cuando son ingeridas en cantidades suficientes (Russo & Johnson, 2000).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 2. Mecanismos de patogénesis de las seis categorías de *E. coli* diarréagénicos. Kaper *et al.*, 2004.

### 1.3.2 *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC)

Dentro de los *E. coli* patógenos extraintestinales (ExPEC) se incluyen los *E. coli* uropatogénicos (UPEC), *E. coli* septicémicos (SEPEC), *E. coli* causantes de la meningitis del recién nacido (NMEC) y *E. coli* patógenos aviáres (APEC). Todos ellos exhiben una diversidad genómica considerable (Russo & Johnson, 2000; Johnson & Russo, 2005; Ewers *et al.*, 2007; Spurbeck *et al.*, 2012) caracterizada por la posesión de varias combinaciones de adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, toxinas, polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, colicinas, proteínas de la membrana externa involucradas en la resistencia al suero, hemaglutinina sensible a la temperatura, proteína específica uropatogénica, invasina IbeA, etc. que en conjunto se denominan factores de virulencia extraintestinales.

Estos factores de virulencia se encuentran frecuentemente asociados en islas de patogenicidad (PAI) y codificados en genes cromosómicos o plasmídicos (Blanco *et al.*, 1992b; Moulin-Schouleur *et al.*, 2006; Bidet *et al.*, 2007; Johnson TJ *et al.*, 2008a; Olesen *et al.*, 2009).

Johnson *et al.*, 2003a propusieron como criterio para la determinación del estatus ExPEC cuando una cepa portase dos o más de los siguientes genes: *papAH* y/o *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *kpsMT II* e *iutA*.

Spurbeck *et al.*, 2012 demostraron la presencia de cuatro genes en cepas de *E. coli* fecales capaces de colonizar la vejiga urinaria, así definieron como cepas UPEC aquellas que poseían tres de los siguientes cuatro genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* e *yfcV*.

En 2015, Mitchell *et al.* propusieron la combinación de pruebas fenotípicas y genotípicas para distinguir diferentes patotipos entre los aislados de cepas ExPEC. Así, definieron cepas UPEC aquellas que cumplían el criterio ExPEC y que crecían en orina y cepas NMEC aquellas cepas ExPEC que poseían los genes *K1* e *ibeA*. Todas ellas eran consideradas cepas SEPEC cuando eran resistentes a la prueba del complemento.

Los principales genes de virulencia asociados a cepas ExPEC se describen en la siguiente tabla (Tabla 1).

**Tabla 1. Principales factores de virulencia de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales.**

Genes		ADHESINAS
<i>fim H</i>	Fimbrias tipo 1: fimbria sensible a la manosa presentes en el 99% de las cepas de <i>E. coli</i> .	
<i>fim AV<sub>MT78</sub></i>	Fimbrias tipo 1: variante del <i>fim A<sub>MT78</sub></i> de las fimbrias tipo 1.	
<i>pap AH</i>	Subunidad principal del eje P (pilus asociado con pielonefritis), define el antígeno F.	
<i>pap C</i>	Pilus de ensamblaje, región central del operon <i>pap</i> .	
<i>pap EF</i>	Fimbrias tipo P: fimbria resistente a la manosa, región central del operón <i>pap</i> , asociado a pielonefritis, urosepsis, cistitis aguda y bacteriuria asintomática. Localizadas en una isla de patogenicidad cromosómica.	
<i>pap GI</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus. Alelo poco frecuente.	
<i>pap GII</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus. Alelo asociado a pielonefritis.	
<i>pap GIII</i>	Fimbrias tipo P: adhesina del extremo del pilus. Alelo asociado a cistitis.	
<i>sfa/foc DE</i>	Fimbrias tipo S: región central de los operones <i>sfa</i> y <i>foc</i> , asociada a septicemia y meningitis	
<i>afa/dra BC</i>	Adhesina resistente a la manosa. Promueven la resistencia bacteriana dentro del tracto urinario. Asociada con ITU infantil y pielonefritis en mujeres embarazadas.	
<i>yfc V</i>	Putativa chaperona acompañante fimbrial.	
		TOXINAS
<i>cnf 1</i>	Factor necrotizante citotóxico (cytotoxic necrotizing factor), asociado a diversas infecciones extraintestinales, así como a necrosis y multinucleación de las células HeLa, Vero y CHO. Localizados en una isla de patogenicidad cromosómica.	
<i>cdt B</i>	Toxina de distensión citoletal (cytolethal distending toxin), asociada a infecciones intestinales y extraintestinales.	
<i>sat</i>	Proteína autotransportadora (secreted autotransporter toxin). Altera el citoesqueleto de las células epiteliales de la vejiga y el riñón, incrementando la habilidad de <i>E. coli</i> para propagarse.	
<i>tsh</i>	Proteína de superficie termosensible que posee la capacidad de aglutinar los enterocitos a 26°C (temperature sensitive hemagglutinin).	
<i>hly A</i>	$\alpha$ -hemolisina, citotoxina calcio dependiente. Facilita el crecimiento de los microorganismos en los tejidos corporales gracias al suministro de iones $Fe^{+3}$ . Asociada a ITU, sepsis, apendicitis, peritonitis y otras infecciones extraintestinales. Localizado en plásmidos o en el cromosoma bacteriano.	
<i>hly F</i>	Hemolisina F.	
<i>vat</i>	Autotransportador serin-proteasa.	
		SIDERÓFOROS
<i>iuc D</i>	Aerobactina (adquisición de hierro). Localizado en plásmidos o en el cromosoma bacteriano.	
<i>iut A</i>	Receptor de la aerobactina.	
<i>iro N</i>	Codifica para el receptor de salmoquelina (sideróforo).	
<i>fyu A</i>	Yersinia receptor de sideróforo.	
<i>chu A</i>	Unión a la membrana externa de la hemoglobina.	
		CÁPSULA
<i>kii-kps MTII</i>	Cápsula del grupo II. Localizado en cepas de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales.	
<i>kps MTII-K2</i>	K2, cápsula grupo II.	
<i>kps MTII-K5</i>	K5, cápsula grupo II.	
<i>neu C-K1</i>	Antígeno K1, relacionado con la resistencia al suero. Cápsula grupo II.	
<i>kps MIII</i>	Cápsula del Grupo III, localizado en cepas de <i>E. coli</i> causantes de infecciones extraintestinales.	
		VARIOS
<i>cva C</i>	Gen estructural de la colicina V, con actividad letal contra ciertos organismos entéricos. Aumenta la supervivencia de las bacteria que la producen. Localizado en plásmidos.	
<i>iss</i>	Proteína que incrementa la supervivencia en suero (increased serum survival).	
<i>tra T</i>	Proteína asociada a la resistencia al suero.	
<i>ibe A</i>	Proteína que contribuye a que la bacteria atraviese la barrera hemato-encefálica (invasion of brain endothelium) y penetre en el sistema nervioso central.	
<i>mal X</i>	Marcador asociado a la isla de patogenicidad PAI.	
<i>usp</i>	Proteína que actúa como una bacteriocina (uropathogenic strain-specific protein). Permite a las cepas lisar otras cepas no virulentas de <i>E. coli</i> que ocupan el mismo nicho, aumentando su infectividad en el tracto urinario.	
<i>omp T</i>	Proteína T de membrana externa.	

Las cepas de *E. coli* patógenos extraintestinales están implicadas en un gran número de infecciones, entre las que destacan las infecciones del tracto urinario y las bacteriemias tanto en seres humanos como en animales.

A pesar de la variedad de patologías que las cepas ExPEC puedan causar en los seres humanos y animales parecen ser incapaces de causar enfermedades entéricas, aunque pueden colonizar el tracto intestinal y formar parte de la microbiota predominante de hospedadores sanos, lo que los convierte en reservorio de este tipo de cepas que en determinadas circunstancias colonizan el tracto urinario o respiratorio pudiendo llegar al sistema sanguíneo y provocar distintos tipos de infecciones.

Este reservorio intestinal de ExPEC es especialmente importante para mujeres con recurrentes infecciones del tracto urinario (ITUs). Se estima que el 50% de las mujeres tendrán una infección urinaria durante su vida, el 25% tendrá una segunda infección y el 3% tendrá una nueva recaída en los seis meses posteriores a la primera infección. Una explicación para este fenómeno es el reservorio de cepas ExPEC en el tracto gastrointestinal de estas pacientes. Las cepas ExPEC persisten durante bastante tiempo como comensales dentro del tracto intestinal y pueden incluso ser compartidas entre miembros de una misma familia y sus mascotas (Johnson JR *et al.*, 2008a; Spurbeck *et al.*, 2012).

La orina y las vías urinarias, en condiciones normales, son estériles y sólo la uretra distal está colonizada por flora cutánea y vaginal. Previamente a un episodio de infección urinaria se produce una colonización vaginal y periuretral persistente a partir de microorganismos procedentes del colon. Desde estas localizaciones, un pequeño número de bacterias ascienden a la vejiga y más excepcionalmente a la pelvis y al parénquima renal. En circunstancias normales estas bacterias son eliminadas por el flujo y las propiedades antibacterianas de la orina, y en menor medida, por la presencia de IgA secretora y los escasos polimorfonucleares presentes

en la superficie vesical. Si dichas bacterias no pueden ser eliminadas, se inicia una colonización o infección dependiendo del equilibrio entre la virulencia de la bacteria, el tamaño del inóculo, los mecanismos defensivos locales y la presencia o no de alteraciones anatómicas o funcionales del tracto urinario (Andreu, 2005). Algunas cepas pueden incluso atravesar la barrera endotelial y entrar en la circulación sanguínea causando bacteremia.

Inicialmente se desarrollaron dos teorías para explicar la relación entre las cepas fecales de *E. coli* y las causantes de ITUs: la teoría de la prevalencia y la teoría de la especial patogenicidad. La primera sostenía que la cepa presente en mayor abundancia en la flora normal intestinal era la que usualmente causaba las ITUs, mientras que la segunda apoyaba la idea de que sólo determinadas cepas con factores de virulencia eran capaces de producir infecciones extraintestinales. Los resultados obtenidos en la década de los ochenta y noventa del siglo pasado confirmaron la validez de la teoría de la especial patogenicidad, ya que se comprobó que estas cepas presentaban una serie de factores de virulencia que les permiten invadir, colonizar y dañar el tracto urinario. No obstante, si las defensas del hospedador están suficientemente disminuidas, incluso cepas con escasos factores de virulencia presentes en la flora intestinal podrían ser potencialmente virulentas (Blanco *et al.*, 1991, 1992b; Johnson, 1991; Mora *et al.*, 2009).

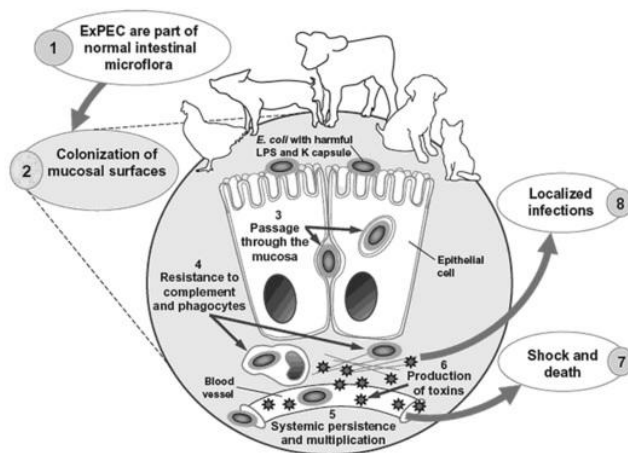
Las cepas ExPEC son responsables del 20 al 30% de las bacteriemias de la comunidad y del 20% de las nosocomiales, siendo el patógeno más prevalente. Comúnmente, estas infecciones se dan en individuos con enfermedades de base o con enfermedades crónicas de larga evolución. Su pronóstico suele ser mejor que la infección por otros microorganismos bacilo gran negativos, con una tasa de mortalidad de entre el 4% y el 18%. No obstante, en los últimos diez años las cepas de *E. coli* bacteriémicas han desarrollado un incremento progresivo de resistencia a antibióticos, lo cual dificulta su

tratamiento (Javaloyas *et al.*, 2003; Oteo *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Naseer *et al.*, 2009).

La meningitis asociada a *E. coli* es una enfermedad que provoca alta mortalidad y morbilidad, en torno al 30%, durante el periodo neonatal. Las cepas de *E. coli* causantes de meningitis (NMEC) tienen la habilidad de sobrevivir en el torrente sanguíneo e invadir las meninges del recién nacido. La infección puede tener lugar en el momento del parto o por transmisión a través del cordón umbilical. El desarrollo de la enfermedad comienza con la colonización e invasión de las mucosas digestivas o respiratorias. A continuación, las bacterias migran al espacio intravascular donde sobreviven y se multiplican, provocando una bacteriemia. Cuando la concentración de bacterias es elevada, atraviesan la barrera hematoencefálica e invaden las meninges y el sistema nervioso central, desencadenando una respuesta inflamatoria que conduce a una disminución de la presión intracraneal, a la formación de edemas y de lesiones neuronales (Kim, 2003; Kaper *et al.*, 2004; Wijetunge *et al.*, 2015).

En rumiantes recién nacidos son frecuentes las colisepticemias. La colonización intestinal de estos animales es facilitada por la ausencia de microbiota al nacimiento y por la multiplicación de estas bacterias invasivas tanto en el torrente circulatorio como en los órganos internos debido a la ausencia de anticuerpos sistémicos maternos que no han atravesado la barrera placentaria durante el embarazo. Los primeros anticuerpos que alcanzan el torrente sanguíneo provienen del calostro. Este paso ocurre durante las 24-36 horas después del nacimiento en rumiantes y en unos días en otras especies (Figura 3).





**Figura 3. Esquema representativo de la patogénesis de las cepas ExPEC en animales. Jacinthe Lachance, Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (Gyles and Fairbrother, 2010).**

La colisepticemia neonatal en terneros, corderos y cabritos recién nacidos puede ocurrir desde el nacimiento hasta sólo unos pocos días de edad. Las manifestaciones dependerán de la cepa invasiva de *E. coli*. Las cepas ExPEC se excretan en las heces de adultos sanos y los recién nacidos se contaminan vía oral al lamerlas. En casos muy agudos no se observan signos clínicos y los animales aparecen muertos en las granjas. En casos agudos, los animales manifiestan signos clínicos poco específicos tales como depresión, apatía, fiebre y normalmente mueren dentro de las 24-48 horas. En estos casos las lesiones no son específicas, e incluyen congestión de órganos internos y acumulación de fluidos en la cavidad peritoneal y pleural. En casos menos graves o subagudos, los animales presentan signos clínicos específicos y lesiones en diferentes órganos, como diarrea, enteritis, distress respiratorio, bronconeumonía, cojeras, artritis, pequeños abscesos en órganos internos, etc.

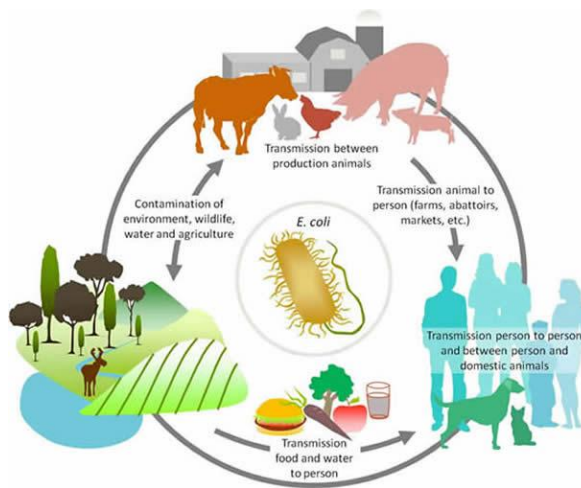
Las cepas de *E. coli* causantes de las septicemias en rumiantes pertenecen a un amplio rango de serogrupos, entre los que se encuentran O8, O9, O15, O45, O78 y O115.

Existen vacunas disponibles para la inmunización de las madres antes del parto y así producir suficientes anticuerpos calostrales. Sin embargo, la eficacia de estas vacunas se ve disminuida por la heterogeneidad de las cepas ExPEC, y por las escasas medidas de higiene en algunas granjas que permiten el contacto entre recién nacidos y heces de animales adultos.

Las infecciones provocadas por cepas UPEC ocurren con más frecuencia en perros, gatos y caballos. Estas cepas tienen un origen fecal y colonizan el tracto urinario debido a factores predisponentes como anormalidades anatómicas, presencia de cálculos o heridas, cólicos, etc. Los signos asociados a este proceso son: disuria, polaiquiuria, estranguria, dolor abdominal, fiebre, depresión y anorexia. Estas cepas también pueden causar metritis y piometra en hembras y prostatitis en los machos. Los serogrupos más frecuentes de estas cepas son O4 y O6.

Las cepas ExPEC de animales y humanos comparten factores de virulencia, lo que sugiere que estos microorganismos podrían ser patógenos zoonóticos. Diversos estudios demuestran la circulación de cepas ExPEC en animales domésticos que tienen un contacto muy cercano con los humanos, sugiriendo la transmisión de estas cepas en cualquiera de las dos direcciones (Gibson *et al.*, 2010) (Figura 4).

Además, por una posible contaminación durante el sacrificio (Bonnet *et al.*, 2009) se han aislado estas cepas en productos alimenticios, concretamente, en carnes crudas y aves de corral, por este motivo, se podrían considerar causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETA). Así, deberían implementarse políticas que limiten la evolución, selección y diseminación de estas cepas desde los animales de producción a los seres humanos (Smith *et al.*, 2007; Bélanger *et al.*, 2011; Manges & Johnson, 2012; 2015; Mitchell *et al.*, 2015; Solá-Ginés *et al.*, 2015).



**Figura 4. Transmisión de *E. coli* entre diferentes nichos ecológicos. Reference Laboratory for Escherichia coli, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal. [www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp](http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp).**

También las aguas de lluvia, ríos, lagos, océanos y aguas residuales han sido investigadas como posibles fuentes medioambientales de ExPEC. Anastasi et al., en 2010 observaron que cepas ExPEC resistían los tratamientos de aguas residuales, provocando una posible contaminación medioambiental (Manges and Johnson, 2015).

#### **1.3.2.1 *E. coli* patógenos aviaries (APEC)**

Las cepas APEC son las responsables de la colibacilosis aviar, tanto en aves domésticas como silvestres. La colibacilosis es la causa de mayor morbilidad y mortalidad en aves de corral y responsable de grandes pérdidas económicas, por encima del 50% en las granjas industrializadas de pollos, pavos y patos de todo el mundo (Blanco *et al.*, 1997; Dziva & Stevens, 2008; Schouler *et al.*, 2012; Mainil & Fairbrother, 2014). Estas pérdidas económicas pueden deberse a una menor producción, a una mayor mortalidad de aves en la explotación, a un mayor número de carcasas decomisadas en mataderos y al aumento de los costes asociados al tratamiento y profilaxis (Guabiraba & Schouler, 2015).

Estas cepas APEC están presentes en las aves de corral como miembros de la microbiota intestinal, pero a diferencia de otras cepas ExPEC, contaminan a las aves a través de la vía respiratoria por inhalación de *E. coli* presente en el polvo de heces secas. Estas cepas inducen diferentes síndromes en las aves, incluyendo infecciones sistémicas y localizadas, actuando tanto como agente primario o como secundario (Barnes *et al.*, 2008). Las formas más típicas de infección localizada son las infecciones del tracto reproductivo, incluyendo salpingitis y peritonitis, onfalitis, infección del saco vitelino, síndrome de la cabeza hinchada, celulitis del abdomen inferior y muslos, osteomielitis y artritis (Gyles & Fairbrother, 2010; Guabiraba & Schouler, 2015; Vilarinho *et al.*, 2016).

Sin embargo, el síndrome más frecuente es la forma sistémica de colibacilosis con un origen respiratorio seguido de una infección sistémica con lesiones fibrinosas características como saculitis, perihepatitis y pericarditis (Figura 5). Este proceso ocurre en broilers, patos y pavos de engorde entre las tres y las 12 semanas de edad.



**Figura 5. Imágenes de colibacilosis aviar. Gibert Perelló, 2010.**

La infección se inicia generalmente por factores predisponentes como agentes víricos (adenovirus, enfermedad de Gumboro, enfermedad de Marek, enfermedad de Newcastle, influenza aviar, etc.), agentes bacterianos (*Mycoplasmas spp*, *Bordetella avium*, *Clostridium perfringens*, etc.), parásitos, deterioro de las condiciones

ambientales de los aviarios (agua contaminada, ventilación inadecuada, temperaturas extremas, superpoblación, niveles elevados de polvo y amoníaco, etc.) y agentes fisiológicos (edad, estrés, picaje, nerviosismo, etc.) (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Barnes *et al.*, 2008; Guabiraba & Schouler, 2015).

Todos estos factores provocan que la respuesta inmune esté dañada y se favorezca la colonización del tracto respiratorio superior e inferior por cepas APEC que están presentes en el ambiente, lo cual conduce a una infección respiratoria. A continuación estas cepas atraviesan el epitelio respiratorio y penetran tanto en la mucosa como en la submucosa de los vasos pulmonares o de los sacos aéreos hasta alcanzar el torrente sanguíneo, como muestra la figura 6. El mecanismo por el cual los APEC alcanzan el sistema circulatorio es actualmente desconocido (Mainil & Fairbrother, 2014).

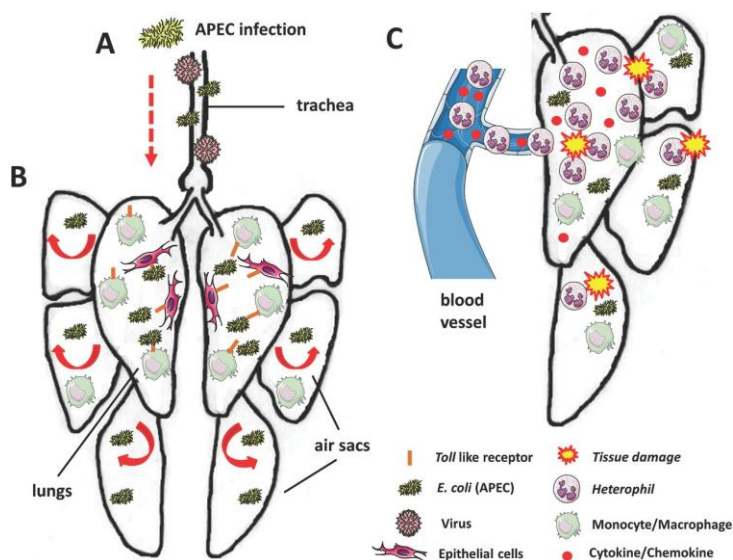
Los genes de virulencia implicados en la colibacilosis aviar son muy numerosos, facilitando que las cepas APEC colonicen tejidos internos y resistan los mecanismos de defensa del hospedador tales como neutrófilos, macrófagos y factor de complemento.

Los genes de virulencia de las cepas APEC codifican para adhesinas (como la fimbria tipo I que es expresada por más del 70% de los APEC durante la colonización de la tráquea, pulmones y sacos aéreos, las fimbrias P, Stg y curli), para factores de defensa (*iss*, lipopolisacárido O78, K1), sistemas de adquisición de hierro (aerobactina, salmoquelina, yersiniabactina), autotransportadores (*tsh*, *vat*), gen *ibeA*, genes que intervienen en el metabolismo del azúcar, etc. (Mainil & Fairbrother, 2014; Guabiraba & Schouler, 2015) (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de virulencia implicados en colibacilosis aviares. Guabiraba &amp; Schouler, 2015.

FUNCTION	NAME
Adhesins	Type I fimbriae
	Stg fimbriae
	P fimbriae
	Autotransporter adhesion AatA
	Curli
	Temperature sensitive hemagglutinin Tsh
	Yqi
Iron acquisition	<i>E. coli</i> common pilus (ECP)
	Aerobactin
	Salmochelin
	System Sit
Antiphagocytic activity/serum resistance	Heme utilization/transport protein ChuA
	K1 capsular polysaccharide
	Increased serum survival (Iss)
	Degenerate type III secretion system 2 (ETT2sepsis)
Metabolism	O78 LPS
	Phosphate transport system (pts)
	Nitrite transporter (NirC)
	Sugar metabolism (Aec35-37)
Two-component regulatory systems	RstA/RstB
	PhoB/PhoR
	BarA/UvrY
Miscellaneous	SsrA/SmpB
	IbeA and IbeB
	Type VI secretion systems
	Transcriptional regulator (YjjQ)
	Vacuolating autotransporter toxin (Vat)
	Flagella (FliC)
	Group 4 capsule

Numerosos estudios han demostrado que todos estos factores de virulencia raramente están presentes en el mismo aislado, lo que indica que los APEC constituyen un grupo heterogéneo. La asociación de estos factores facilita que las cepas APEC utilicen diferentes estrategias para invadir al hospedador (Schouler *et al.*, 2012).



**Figura 6. Esquema ilustrativo de la respuesta inflamatoria del tracto respiratorio tras la entrada de cepas APEC. Guabiraba & Schouler, 2015.**

El sistema de diagnóstico más utilizado para detectar estas cepas es el serotipado. En Europa, seis serogrupos, O1, O2, O5, O8 y O78 representan el 56.5% de los aislados APEC. Este método no es una buena herramienta de diagnóstico ya que sólo permite la identificación de un número limitado de cepas APEC (Schouler *et al.*, 2012).

Johnson TJ *et al.*, 2008b determinaron un subgrupo de cinco genes de virulencia (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*) que permitía identificar cepas APEC, aunque el margen de error era del 14.6%.

Mora *et al.* en 2010 asociaron los genes *tsh*, *iroN*, *kpsMII K1*, *cvaC* e *iss* a cepas APEC. Posteriormente, en el año 2012 Schouler *et al.* idearon una nueva estrategia



diagnóstica basada en cuatro patrones de virulencia, permitiendo la identificación del 70.2% de las cepas APEC: patrón de virulencia A (*iutA* +, P(F11)+), B (*iutA*+, P(F11) -, *frz<sub>orf4</sub>*+), C (*iutA*+, P(F11) -, *frz<sub>orf4</sub>* -, O78 +) y D (*iutA*+, *sitA* +, *aec26* +). Este esquema de diagnóstico tiene un margen de error menor que si se utilizase el serotipado.

Mitchell *et al.*, 2015 utilizaron un nuevo criterio para definir a las cepas APEC basándose en la presencia como mínimo de cuatro de los siguientes cinco grupos de genes, así, el grupo I constaba del gen *kii*, el grupo II del gen *iss*, el grupo III del gen *tsh*, el grupo IV constaba de uno de los siguientes cinco genes: *sfa*, *foc*, *papA*, *papC* y *papEF* y el grupo V lo formaba el gen *iutA* o *fyuA*.

Las medidas profilácticas utilizadas en la colibacilosis están basadas en un control estricto de las condiciones de cría, en medidas de bioseguridad y la vacunación. Sin embargo, las vacunas no son muy efectivas debido a la gran variedad de serogrupos de las cepas APEC y que la colibacilosis aviar puede ser una infección secundaria. Es muy común el uso de autovacunas y bacterinas específicas de cada rebaño (Landman *et al.*, 2014). La colibacilosis puede ser tratada con antibioterapia, los residuos de estos agentes en los animales destinados a consumo humano junto con el incremento en los fallos terapéuticos debido a las resistencias bacterianas, provoca un gran problema de salud pública (Pallett & Hand, 2010).

El potencial zoonótico de estas cepas ha sido el centro de numerosas discusiones ya que muchas cepas APEC y ExPEC humanas comparten serogrupos, grupos filogenéticos y perfiles de virulencia. Futuros estudios deben ir encaminados a estudiar si los APEC pueden transmitirse a los humanos a través de la cadena alimentaria y la posibilidad de contaminación cruzada hacia otros mamíferos (Mainil & Fairbrother, 2014; Mangues & Johnson, 2015; Mitchell *et al.*, 2015).



#### 1.4 Antibióticos $\beta$ -lactámicos y $\beta$ -lactamasas

En 1929 el Dr. Alexandre Fleming descubrió una sustancia antibacteriana producida por el hongo *Penicillium notatum*, a la que denominó penicilina. Actualmente las penicilinas son los antibióticos más ampliamente utilizados, tanto en medicina humana como veterinaria.

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son bactericidas e inhiben la síntesis de la pared bacteriana al impedir la última etapa de la síntesis del peptidoglucano, la transpeptidación. Su actividad la ejercen actuando como análogos estructurales del sustrato natural, D-alanil-D-alanina, de las transpeptidasas y carboxipeptidasas (Coira, 2008; Murray *et al.*, 2006).

Los preparados  $\beta$ -lactámicos originales se obtuvieron a partir de hongos y bacterias. Sin embargo, el verdadero punto de partida en el desarrollo de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos tuvo lugar con la síntesis del núcleo de las penicilinas y las cefalosporinas, el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA) y el ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA), que ha permitido la obtención de numerosas penicilinas y cefalosporinas semisintéticas.

Casi todos los preparados de esta familia son bicíclicos, es decir, el núcleo  $\beta$ -lactámico está unido a un segundo anillo que varía en los diferentes grupos. Existen, sin embargo, preparados monocíclicos, como los monobactamas. Las principales familias de antibióticos  $\beta$ -lactámicos son penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos (Tabla 3).

Tabla 3. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Muñoz & Porrero, 2016.

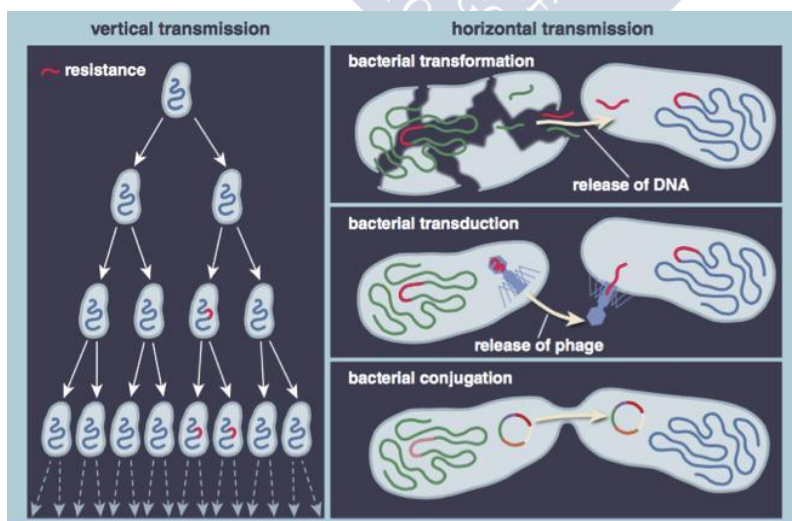
ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS		
PENICILINAS	Penicilinas naturales	Bencilpenicilina/penicilina G, penicilina V
	Resistentes a penicilinasas	Meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina
	Aminopenicilinas	Ampicilina, amoxicilina
	Carboxipenicilinas	Carbenicilina, ticarcilina
	Ureidopenicilinas	Piperacilina, mezlocilina
	Combinaciones con inhibidor de $\beta$ -lactamasas	Ampicilina/sulbactam Amoxicilina/ácido clavulánico Ticarcilina/ácido clavulánico Piperacilina/tazobactam
CEFALOSPORINAS Y CEFAMICINAS	Cefalosporinas de 1ª generación	Cefalexina, cefalotina, cefazolina, cefapirina, cefalonio
	Cefalosporinas de 2ª generación	Cefaclor, cefuroxima, cefamandol
	Cefamicinas de 2ª generación	Cefoxitina, cefotetán
	Cefalosporinas de 3ª generación	Cefixima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefpodoxima, ceftiofur
	Cefalosporinas de 4ª generación	Cefepima, cefpiroma, cefquinoma
	Cefalosporinas de 5ª generación	Ceftarolina, ceftobiprol
CARBAPENEMES		Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
MONOBACTÁMICOS		Aztreonam

La producción de  $\beta$ -lactamasas es el mecanismo más común utilizado por las bacterias gram negativas para resistir a la acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En los últimos años la incidencia de este tipo de bacterias ha ido en aumento causando infecciones con mayor morbilidad y mortalidad, altos costes sanitarios y limitando las opciones terapéuticas (Al-Bayssari *et al.*, 2015). Las  $\beta$ -lactamasas de las bacterias gram negativas permanecen dentro de la célula e inactivan a los antibióticos  $\beta$ -

lactámicos en el espacio periplásmico, entre la membrana externa y la membrana citoplasmática de la bacteria.

Los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas pueden ubicarse en el cromosoma bacteriano, en secuencias de inserción, integrones, transposones y plásmidos, elementos genéticos ampliamente distribuidos, extremadamente diversos y en continua evolución.

Hay dos principales mecanismos implicados en la evolución y desarrollo de las resistencias a antibióticos. El primero de ellos ocurre durante el proceso evolutivo, las células bacterianas acumulan errores genéticos y transfieren esos genes resistentes a la progenie, es una transmisión vertical. El segundo mecanismo implica una transferencia horizontal y la adquisición de material genético externo que codifique genes de resistencia. Mecanismos como la transformación, la transducción o la conjugación son las principales vías por las que se pueden adquirir estos genes y por las que esta resistencia puede transmitirse de una célula a otra aunque sean de distinta especie bacteriana (Navarro & Miró, 2007; Founou *et al.*, 2016) (Figura 7).



**Figura 7. Principales mecanismos implicados en la evolución y desarrollo de las resistencias a antibióticos.**  
Dantas & Sommer, 2014.

Se han descrito más de 890  $\beta$ -lactamasas diferentes. Bush en el año 1989 propuso una clasificación basada en la actividad enzimática o afinidad de las enzimas por diferentes sustratos y su sensibilidad a la acción inhibidora por el ácido clavulánico. Esta clasificación fue revisada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros y actualizada en 2010 por Bush y Jacoby (Tabla 4 y Figura 8).

**Tabla 4. Clasificación de las  $\beta$ -lactamasas. Bush & Jacoby, 2010.**

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- $\beta$ -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- $\beta$ -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and ceftiofame	RTC-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- $\beta$ -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- $\beta$ -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

<sup>a</sup>CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

<sup>b</sup>NI, not included.

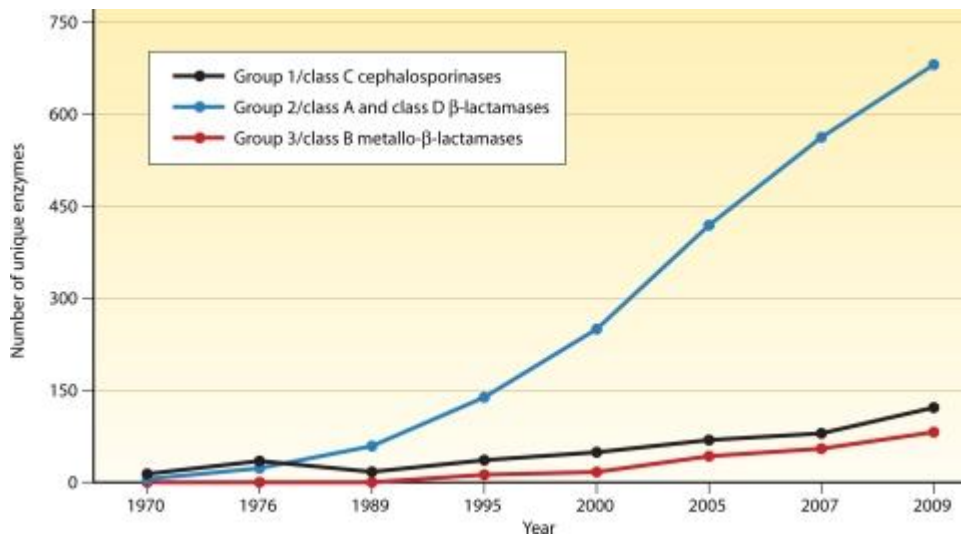


Figura 8. Evolución a lo largo de los años de las distintas  $\beta$ -lactamasas. Bush & Jacoby, 2010.

Por otro lado Ambler en 1980 propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las  $\beta$ -lactamasas en la que distinguen cuatro clases de enzimas designados como A, B, C y D. Tanto la clasificación de Bush y Jacoby como la de Ambler están correlacionadas (Calvo *et al.*, 2011).

De entre todas las  $\beta$ -lactamasas descritas hasta el momento, caben destacar por su interés e implicaciones clínicas las siguientes:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE),  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC y carbapenemasas.

#### 1.4.1 *$\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE)*

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se definen como enzimas capaces de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos, pero no a cefamicinas ni a carbapenemas. Pueden ser inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que

facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas.

Estas enzimas derivan por mutaciones puntuales de otras  $\beta$ -lactamasas con menor espectro como TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Actualmente se han descrito los siguientes tipos de BLEE distribuidos por todo el mundo: TEM, SHV, CTX-M & Toho  $\beta$ -lactamasas, OXA, PER, VEB-1, GES-1, BES, TLA, SFO, IBC y CME (Al-Bayssari *et al.*, 2015).

La primera BLEE, SHV-2, fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* en Alemania en 1983.

En 1989 se describió un nuevo tipo de BLEE, las cefotaximasas o CTX-M, prácticamente de forma simultánea en una cepa de *E. coli* en Alemania y en una cepa de *Salmonella* en Argentina. Estas enzimas se caracterizan por conferir resistencia de alto nivel a la cefuroxima, cefotaximo y cefepima, sin incrementar las CMI de la ceftazidima, ya que la actividad hidrolítica frente a este último antibiótico es mínima comparada con la de las otras cefalosporinas. Estas BLEE, de naturaleza plasmídica al igual que las TEM o SHV, derivan de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera* (Oliver & Cantón, 2003).

En la actualidad se conocen al menos 168  $\beta$ -lactamasas de tipo CTX-M (<http://www.lahey.org/studies>) agrupadas en torno a 5 familias de enzimas diferentes según su secuencia de aminoácidos, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 como muestra la Tabla 5. Dos grupos adicionales se han identificado recientemente CTX-M-74 y CTX-M-75 (Lahlaoui *et al.*, 2014). Cada uno de estos grupos está relacionado con  $\beta$ -lactamasas cromosómicas de diferentes especies de *Kluyvera* que podrían haberse movilizado a través de secuencias de inserción (*ISCR1*, *ISEcp1*) y posterior incorporación en integrones y transposones (Cantón *et al.*, 2012).

Tabla 5. Diferentes grupos, familias o clusters de enzimas BLEE tipo CTX-M y su origen. Cantón & Coque, 2006, modificada por Rossolini *et al.*, 2008.

	GRUPOS/FAMILIAS/CLUSTERS				
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Año, enzima y país	1989 CTX-M-1 Alemania	1986 FEC-1 Japón	1996 CTX-M-8 Brasil	1994 CTX-M-9 España	2000 CTX-M-25 Canadá
Enzimas	CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 42, 52, 53, 54, 57, 58, 60, 61	CTX-M-2, 4, 5, 6, 7, 20, 31, 35, 43, 44 (TOHO-1)	CTX-M-8, 40, 63	CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 38, 45 (TOHO-2), 46, 47, 48, 49, 50, 51, 55, 65	CTX-M-25, 26, 39, 41
Origen	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	<i>Kluyvera georgiana</i>	No definido

A diferencia de otras BLEE, la familia CTX-M constituye un grupo jerárquico complejo y muy heterogéneo (Cantón *et al.*, 2012). Debido a su amplia y explosiva diseminación por todo el mundo se le ha denominado como la “pandemia CTX-M” afectando tanto a pacientes hospitalizados como de la comunidad, siendo *E. coli* el principal patógeno productor de estas enzimas (Cantón & Coque, 2006) (Figura 9).

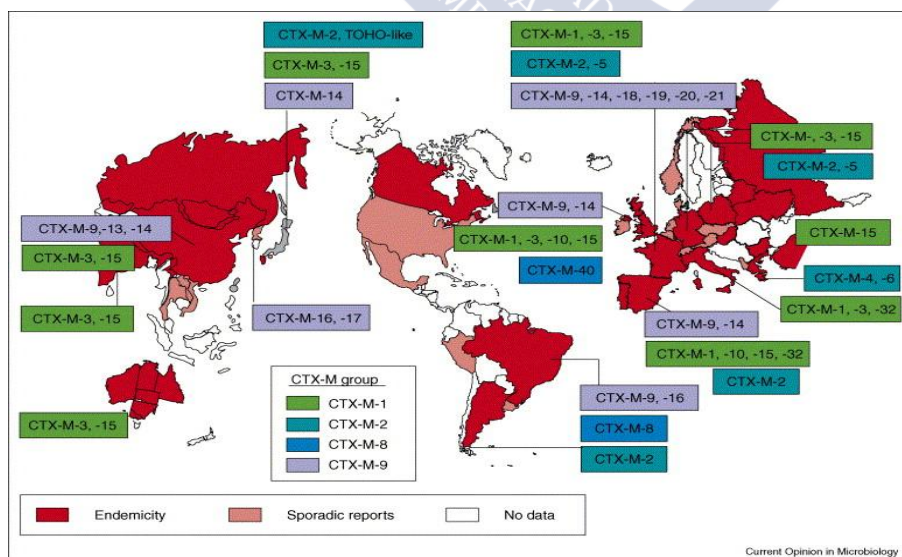


Figura 9. Distribución de los principales grupos de CTX-M en humanos. Cantón & Coque, 2006.



#### 1.4.2 ***Expansión de BLEE en animales de producción y de compañía***

En 1998 se aisló la primera bacteria de origen animal portadora de BLEE, se trataba de una cepa de *E. coli* productora de la betalactamasa SHV-12 aislada en España en un perro con patología urogenital (Teshager *et al.*, 2000).

A partir de esta fecha, numerosas publicaciones hacen referencia a la presencia de BLEEs en animales destinados al consumo humano como caballos, cerdos, conejos y ganado vacuno, así como en sus subproductos (Blanc *et al.*, 2006; Jouini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Escudero *et al.*, 2009; Locatelli *et al.*, 2009; Poeta *et al.*, 2010; Ben Sallem *et al.*, 2012; Huijbers *et al.*, 2013; Friesse *et al.*, 2013; Leistner *et al.*, 2013; Reist *et al.*, 2013; Schmid *et al.*, 2013; Carmo *et al.*, 2014; de Been *et al.*, 2014; Rasheed *et al.*, 2014; Valentin *et al.*, 2014; Von Salviati *et al.*, 2014; Dahms *et al.*, 2015; Kar *et al.*, 2015).

El sector de la acuicultura, que ha experimentado un vertiginoso crecimiento en los últimos años, también desempeña una función importante en la cadena mundial de suministro de alimentos. La presencia de residuos medicamentosos en los productos piscícolas puede afectar tanto a las personas que lo consuman como a su distribución en el medio acuático, favoreciendo la selección de bacterias resistentes (Jiang *et al.*, 2012; Trott. 2013). Una bacteria intestinal como *E. coli* puede ser fácilmente diseminada en diferentes ecosistemas a través del agua (Park *et al.*, 2012).

El tracto intestinal de los animales de producción, principalmente de las aves, es un importante reservorio de cepas de *E. coli* BLEE, desde que Briñas *et al.*, en 2003 publicaran la presencia de las enzimas CTX-M-14, SHV-12 y CMY-2 en heces de pollos sanos en España, han sido numerosos los estudios que indican la elevada presencia de estas bacterias en las aves de producción y sus derivados (Blanc *et al.*, 2006; Girlich *et al.*, 2007; Jouini *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009; Bortolaia *et al.*, 2010; Bortolaia *et al.*, 2011; Egea *et al.*, 2011; Leverstein-van



Hall *et al.*, 2011; Overdevest *et al.*, 2011; Abreu *et al.*, 2013; Dierikx *et al.*, 2013; Laube *et al.*, 2013; Carmo *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014; Huijbers *et al.*, 2014; Kawamura *et al.*, 2014; Laube *et al.*, 2014; de Been *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2014; Rasheed *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2014; Zarfel *et al.*, 2014; Batista *et al.*, 2015; Blaak *et al.*, 2015; Kar *et al.*, 2015; Kilani *et al.*, 2015; Börjesson *et al.*, 2016).

Se ha observado como ha ido aumentando la prevalencia de estas cepas en broilers sanos durante los últimos años. Así, Briñas *et al.*, 2003 detectaron en España un 4.2% de *E. coli* BLEE en 2001, Girlich *et al.*, 2007 en Francia un 10.7% en 2005, Randall *et al.*, 2011 un 50% en Gran Bretaña, Geser *et al.*, 2011 un 63.4% en Suiza, Abreu *et al.*, 2013 en España un 86.6%, Huijbers *et al.*, 2014 un 96.4% en Holanda en 2011 y finalmente Blaak *et al.*, 2015 observaron un 81% de BLEEs en los Países Bajos durante los años 2011- 2012.

BLEEs han sido encontrados en todos los niveles de la producción piramidal de broilers, se diseminan muy rápido, lo que facilita las altas prevalencias en las granjas y posterior contaminación de la cadena alimentaria (Dierikx *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2014). Tanto EFSA, 2015 como Börjesson *et al.*, 2016 llegaron a la conclusión de que la carne de pollo podría ser una vía de transmisión de cepas BLEE a humanos actuando las aves de corral como reservorios.

También existen estudios que consideran que el contacto con animales de compañía puede ser un factor de riesgo para la transmisión de estas cepas ya que se ha encontrado elevados porcentajes de BLEEs en gatos (12.1%) y perros sanos (7.8%). Hay evidencias que demuestran que al estar en contacto tanto humanos como animales comparten el mismo tipo de BLEE (Wieler *et al.*, 2011, Huijbers *et al.*, 2014).

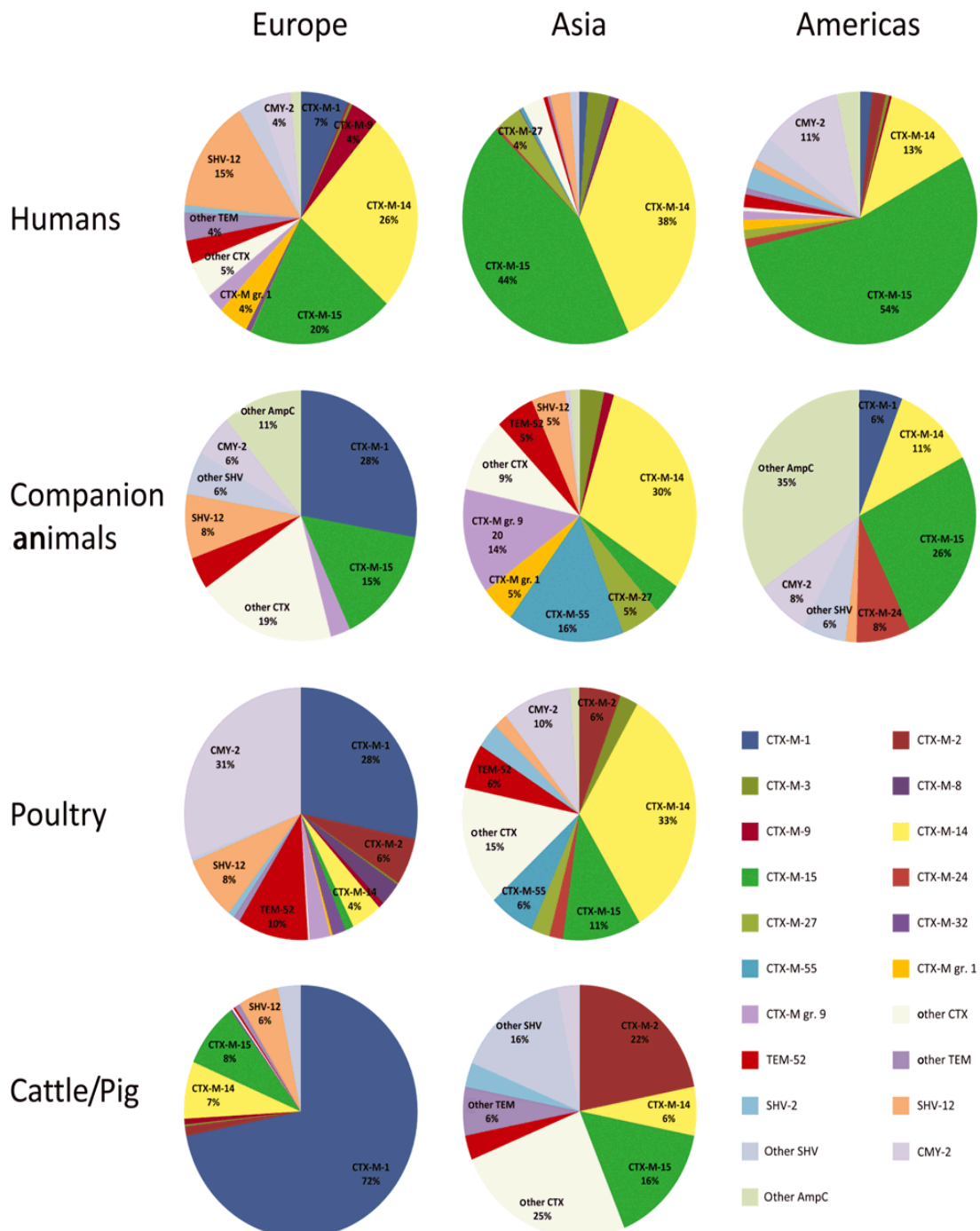


Figura 10. Distribución de BLEEs en diferentes hospedadores y continentes. Ewers *et al.*, 2012.

Los numerosos estudios que hay acerca de la presencia de BLEE en animales de producción o de compañía sugiere que estos animales no solo actúan como meros reservorios sino que podrían transmitir estos patógenos al ser humano de manera directa o indirectamente contribuyendo al desarrollo de los mismos (Ewers *et al.*, 2012; Kar *et al.*, 2015) y creando un gran problema de salud pública (Kilani *et al.*, 2015). En este sentido existe una gran interacción entre humanos, animales y su microbiota tanto comensal como patógena, que dificulta las distintas investigaciones epidemiológicas. Para entender mejor estas conexiones y para reducir el desarrollo de resistencias e infecciones tanto en humanos como animales es necesario crear el concepto de “One Health” (Ewers *et al.*, 2012; Parmley *et al.*, 2013).

Es difícil saber el grado de implicación que ha podido tener la amplia detección de BLEE en animales con la evolución creciente en humanos en los últimos años. El empleo de cefalosporinas de amplio espectro en animales podría ser un factor de selección de bacterias portadoras de BLEE (Ferreira *et al.*, 2014), aunque no es el único factor implicado en este proceso. Generalmente, los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> se localizan en plásmidos o estructuras de tipo integrón asociadas a genes de resistencia a otros antibióticos no  $\beta$ -lactámicos como sulfamidas, aminoglucósidos y quinolonas entre otros. Se podría pensar en procesos de co-selección por el uso incorrecto de estos antibióticos no  $\beta$ -lactámicos (Briñas *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2013) limitando las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones graves (Báez *et al.*, 2015). Por este motivo, la prudencia en el uso de antimicrobianos es tan necesaria en veterinaria como en medicina humana para minimizar la selección de genes de resistencia (Ma *et al.*, 2009; Ewers *et al.*, 2012). También se ha observado una mayor prevalencia de BLEEs en granjas de aves de producción a las que se les ha suministrado una premezcla de antibióticos y antiparasitarios en relación con las que sólo han consumido antibióticos (Dierikx *et al.*, 2013).

Además, la gran persistencia y recirculación de este tipo de cepas, la transmisión vertical, el sistema de cría intensiva, el hacinamiento al que se ven sometidos con frecuencia los animales y el intenso comercio entre los distintos países facilitan enormemente el intercambio de bacterias o de genes de resistencia entre ellos. Por este motivo, la cadena alimentaria puede ser un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia al hombre (Moodley & Guardabassi, 2009; Overdevest *et al.*, 2011; Ben Sallem *et al.*, 2012; Abreu *et al.*, 2013; Dierikx *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2014; Rasheed *et al.*, 2014).

Sin embargo, otros estudios van encaminados a demostrar que existe una transferencia horizontal de genes a través de plásmidos, transposones e integrones entre diferentes poblaciones de *E. coli* (Carmo *et al.*, 2014; de Been *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2014; Kilani *et al.*, 2015). Por lo que estaríamos ante un nuevo problema, ya que la transmisión de genes a través de estos elementos móviles ha sido mucho más rápida que el descubrimiento de nuevos antibióticos (Hasan *et al.*, 2014).

Con todo esto, las autoridades sanitarias deberían implementar medidas estratégicas para controlar la producción de estas bacterias multirresistentes, así, son necesarias unas buenas prácticas de higiene desde “la granja a la mesa” especialmente en mataderos y en todo el sistema de producción, controlando los puntos críticos y evitando la contaminación del medio ambiente a través del contenido intestinal de las canales (Dierikx *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2014; Rasheed *et al.*, 2014).

También se debería reducir el consumo de antibióticos y sobre todo cefalosporinas, en hospitales, animales de compañía, de producción y en la sociedad en general, mejorar las medidas de higiene y de bioseguridad y controlar exhaustivamente el uso de aguas residuales no tratadas. Estas medidas ya están siendo consideradas en países europeos como Dinamarca (Carmo *et al.*, 2014; Olsen *et al.*, 2014).

#### 1.4.3 *Expansión de BLEE en la fauna silvestre*

Desde el año 2006 se han publicado numerosos estudios acerca de la presencia de cepas de *Escherichia coli* portadoras de betalactamasas de espectro extendido en la fauna silvestre, principalmente en especies aviares como las aves de presa (Costa *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010; Guenther *et al.*, 2012), las aves acuáticas (Poeta *et al.*, 2008; Dolejska *et al.*, 2009; Bonnedahl *et al.*, 2009; Hernandez *et al.*, 2010; Bonnedahl *et al.*, 2010; Literak *et al.*, 2010; Simoes *et al.*, 2010; Wallensten *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2013; Bonnedahl *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2014; Báez *et al.*, 2015) y otro grupo de aves consideradas “domésticas” o de jardín como patos, gansos, cisnes, palomas, passerines... (Literak *et al.*, 2010; Guenther *et al.*, 2010a; Garmyn *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). En estos últimos se ha encontrado una menor prevalencia, posiblemente debido a las diferencias en la composición de su flora intestinal (microbiota). En este sentido, se han encontrado porcentajes muy bajos de BLEEs en sitios tan dispares como en las islas Azores con un 0.5% (Silva *et al.*, 2011) y en zonas muy pobladas de Alemania con un 2.3% (Guenther *et al.*, 2010a).

También se han encontrado *E. coli* BLEEs en ciervos, zorros, jabalís, roedores y peces marinos como la dorada (*Sparus aurata*) lo que indicaría una posible diseminación de estas bacterias en el océano atlántico (Costa *et al.*, 2006; Poeta *et al.*, 2009; Literak *et al.*, 2009; Guenther *et al.*, 2010b; Ho *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2011).

Las moscas también pueden actuar como vehículo transmisor entre diferentes nichos ecológicos debido a su capacidad para volar largas distancias, entre 0.5 y 4 km. llegando incluso a recorrer 30 km, y su atracción por alimentos y materia orgánica en descomposición. Además su tracto digestivo es muy adecuado para la transferencia horizontal de genes entre bacterias, lo cual contribuye a la diseminación y transporte

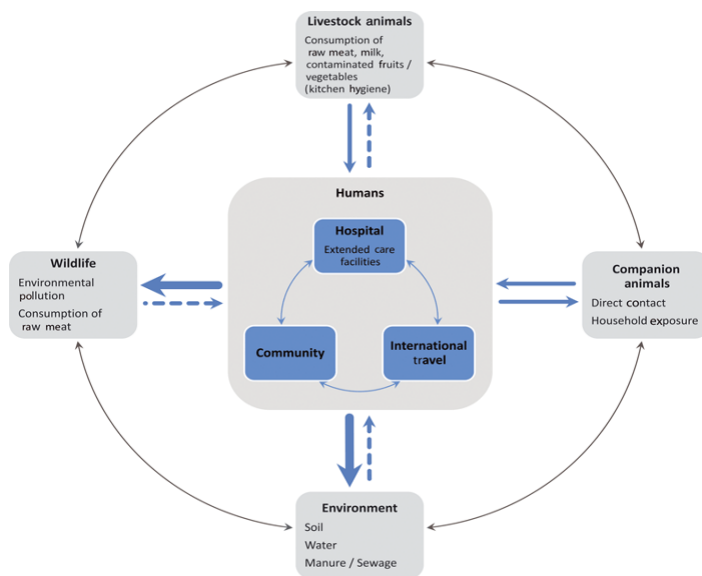
de genes de resistencia localizados en elementos genéticos móviles desde las granjas de aves a la población en general contaminando alimentos destinados al consumo humano (Blaak *et al.*, 2014, 2015; Solá-Ginés *et al.*, 2015 ).

La fauna silvestre no está expuesta al uso continuado de agentes antimicrobianos pero pueden adquirir resistencias a estos agentes a través del contacto con los humanos, animales domésticos y el medio ambiente, donde el agua contaminada con heces parece ser uno de los vectores más importantes (Pinto *et al.*, 2010; Veldman *et al.*, 2013) .

Las rutas de transmisión son en gran parte desconocidas pero parece improbable que estos patógenos aislados de la fauna silvestre hayan adquirido resistencias a través de nuevas mutaciones en sus respectivos genes. Podría ser más probable una transferencia horizontal de estos genes de resistencia desde aislados clínicos tanto humanos como de animales, granjas de producción y mataderos entre otros, a través de bio aerosoles (Guenther *et al.*, 2011; Vredenburg *et al.*, 2014). Laube *et al.*, en 2014 encontraron *E. coli* BLEEs en muestras de aire a 50 m de una granja de broilers infectada por estas bacterias, además dicha granja se encontraba entre un matadero (100 m) y una planta de tratamiento de aguas residuales (500 m). Blaak *et al.*, 2015 también detectaron este tipo de bacterias en porcentajes elevados en aguas de escurritía, aguas de lavado y aguas de superficie próximas a granjas de aves, así como, en polvo, suelo y aire del interior de dichas granjas.

La constante presión antimicrobiana desde granjas de ganado, acuicultura, agricultura, salud pública y clínicas veterinarias al medio ambiente, conlleva una importante liberación de antibióticos a través del estiércol, desperdicios (Guenther *et al.*, 2011; Veldman *et al.*, 2013) o aguas residuales, así, las plantas de tratamiento de este tipo de aguas son consideradas como los mayores recipientes o distribuidores de resistencias a antimicrobianos de las áreas urbanas (Manaia *et al.*, 2012; Rizzo *et al.*,

2013) con la consecuente contaminación del medio ambiente y la vida salvaje (Figura 11).



**Figura 11. Diagrama ilustrativo de la transmisión entre diferentes hábitats. Ewers *et al.*, 2012.**

Muchos autores consideran fundamental para la diseminación de este tipo de bacterias el potencial zoonótico y el comportamiento antropogénico de *E. coli*, ya que se han encontrado bacterias genéticamente similares tanto en infecciones sistémicas en aves y animales domésticos como en infecciones urinarias humanas o meningitis neonatales (Ewers *et al.*, 2007; Moulin-Schouleur *et al.*, 2007; Bonnedahl *et al.*, 2009, 2010; Guenther *et al.*, 2010a; Hernandez *et al.*, 2010; Simoes *et al.*, 2010; Hasan *et al.*, 2014; Bonnedahl *et al.*, 2014).

Sin embargo, otros autores consideran que las altas prevalencias de determinados genes en aves silvestres, sugiere la transmisión desde animales de producción al medio ambiente y consecuentemente a animales silvestres más que a través de fuentes humanas (Guenther *et al.*, 2012).

Las aves de presa, acuáticas y los llamados “pájaros de jardín” parecen representar un notable reservorio de fuentes de *E. coli* multiresistentes y por lo tanto constituir un considerable peligro para la salud de humanos y animales (Guenther *et al.*, 2010a). Así, aves que viven próximas a los humanos como las gaviotas, pueden ser importantes reservorios y vectores de resistencia a antibióticos en el medio ambiente, actuando como bioindicadores (Bonnedahl *et al.*, 2009; Simoes *et al.*, 2010; Wallensten *et al.*, 2011; Guenther *et al.*, 2012; Vredenburg *et al.*, 2014).

Estas aves están frecuentemente en contacto con ambientes que padecen el fuerte impacto de la contaminación fecal tales como humedales, praderas, campos de agricultura, arroyos, plantas de tratamiento de residuos, adquiriendo estas resistencias a través de la comida, además recorren grandes distancias geográficas que facilitan la diseminación de estos genes (Costa *et al.*, 2006; Pesapane *et al.*, 2013; Veldman *et al.*, 2013).

Mientras que el aumento de estas bacterias en las aves acuáticas puede ser explicado por la contaminación fecal del agua por humanos o granjas, en las aves de presa la presencia de BLEEs la adquieren a través de sus presas como ratones o musarañas, que están más en contacto con humanos o animales de producción (Marrow *et al.*, 2009; Kozak *et al.*, 2009; Literak *et al.*, 2009; Ho *et al.*, 2011), aunque se ha visto en Alemania una baja prevalencia en este tipo de roedores (Guenther *et al.*, 2010b).

El nivel de resistencia bacteriana observada en animales salvajes parece estar relacionado con el grado de actividad humana (Allen *et al.*, 2010). A pesar de esto, numerosos estudios hablan de la presencia de BLEEs en sitios remotos, como el desierto de Gobi en Mongolia, donde se ha observado en aves de presa un porcentaje de BLEEs similar al obtenido en áreas más pobladas del centro de Europa (Guenther *et al.*, 2012). Estos hallazgos sugieren la influencia de la migración, ya que las aves migratorias recorren largas distancias buscando comida y hábitat, estando expuestas



a materia fecal tanto animal como humana. Esto podría explicar los hallazgos de BLEEs en animales que no son expuestos a antibióticos (Radhouani *et al.*, 2010). Los pájaros silvestres podrían actuar como un espejo de las actividades del hombre y así servir como “melting pot” para la creación de nuevas variantes de *E. coli* resistentes (Bonnedahl *et al.*, 2009; Hasan *et al.*, 2014).

La migración podría contribuir a la diseminación de resistencias por todo el mundo como así confirma recientemente Báez *et al.*, 2015, al estudiar gaviotas del norte de Chile que habían emigrado de EE. UU y Canadá, en las que se aislaron cepas que eran prevalentes en Norteamérica y no en Chile. Estas resistencias a antibióticos detectadas en la microbiota intestinal eran adquiridas en sus países de origen, como previamente fue observado en humanos que viajaban habitualmente (Peirano *et al.*, 2011). También Börjesson *et al.*, 2016 observaron en pacientes sanos suecos que viajar al continente asiático o africano era un factor de riesgo para la adquisición de estas cepas.

Con todo esto podemos concluir que las aves migratorias podrían actuar tanto como bio-indicadores ambientales como reservorios de patógenos y genes de resistencia, jugando un papel importante en la epidemiología de la diseminación de nuevas resistencias (Hasan *et al.*, 2014).

Los porcentajes de BLEEs encontrados en aves de presa varían desde un 10.8% en el desierto de Gobi en Mongolia (Guenther *et al.*, 2012), un 13.8% en zonas muy habitadas de Alemania (Guenther *et al.*, 2012), un 15.2% en el parque natural Pênedas Gêres en Portugal (Radhouani *et al.*, 2010), un 26.9 % en la reserva natural da Serra da Estrela en Portugal (Pinto *et al.*, 2010) hasta un 36% en parques naturales del norte y centro de Portugal (Costa *et al.*, 2006).

En aves acuáticas nos encontramos con porcentajes muy similares, así en una zona muy habitada del sur de Francia nos encontramos un 9.4% BLEEs (Bonnedahl *et al.*,

2009), en los países bajos un 15.7% (Veldman *et al.*, 2013), en la bahía de Bengal (Hasan *et al.*, 2014) un 17.3%, en la reserva natural isla Berlengas de Portugal un 19.3% (Poeta *et al.*, 2008), en Alaska un 37% (Bonnedahl *et al.*, 2014) y en Antofagasta, en el norte de Chile, se ha detectado un 54% de BLEEs (Báez *et al.*, 2015).

Considerando el hecho de que las aves silvestres no están expuestas a altas dosis de antibióticos, estos resultados son bastante preocupantes.

### 1.5 **Grupo clonal ST131**

En el año 2008, varios grupos de investigadores liderados por Nicolas-Chanoine identificaron en tres continentes la presencia del grupo clonal O25:H4-ST131, expandido a nivel mundial tanto en hospitales como en la comunidad. Las cepas que pertenecían a este grupo clonal presentaban características similares entre sí; el mismo grupo filogenético B2, el mismo serotipo O25:H4, productoras de CTX-M-15 y secuencia tipo ST131. Las cepas de este clon poseían de siete a 14 genes de virulencia de los cuales cinco eran comunes (*fimH*, *sat*, *fyuA*, *usp* y *malX*) lo que las clasificaba como ExPEC (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

Clermont *et al.*, 2008 comprobaron que las cepas del grupo clonal O25:H4-ST131 tenían una variante del antígeno somático O25 a la que denominaron O25b.

Determinados genes de virulencia han sido encontrados uniformemente en este clon, tales como *sat*, *fimH*, *fyuA*, *kpsMT II*, *usp*, *malX*, *ompT*, *iha*, *iucD*, *iutA* y *traT*. La mayoría de las cepas del clon ST131 investigadas hasta el momento pueden considerarse ExPEC (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014). Sin embargo, el número de perfiles de virulencia de este clon ha ido aumentando a medida que se van realizando nuevos estudios. Blanco *et al.*, 2013 establecieron un esquema de clasificación en cuatro virotipos (A, B, C, D), basándose en la presencia o ausencia de cuatro genes

de virulencia (*afaFM955459*, *iroN*, *ibeA* y *sat*), que ha sido ampliado recientemente (Dahbi *et al.*, 2014). El nuevo esquema de virotipado se basa en 13 genes de virulencia (*afa/draBC*, *afaFM955459*, *iroN*, *ibeA*, *sat*, *papGII*, *papGIII*, *cnf1*, *hlyA*, *cdtB*, *neuC-K1*, *kpsMII-K2* y *kpsMII-K5*) e incluye 12 virotipos (A, B, C1, C2, C3, D1, D2, D3, D4, D5 y E), siendo el virotipo C el más prevalente a nivel mundial. Esta variabilidad también se ha demostrado mediante el sistema de MLST del Instituto Pasteur, e incluso por serotipado, así, recientemente se ha observado que algunas cepas del grupo clonal ST131 pertenecen al serotipo O16:H5 (Blanco *et al.*, 2013; Mora *et al.*, 2014; Dahbi *et al.*, 2014).

El clonotipado basado en la secuenciación de los genes *fumC* y *fimH<sub>TR</sub>* ha permitido identificar diferentes subclones entre los que destacan: CH40-30, CH40-22 y CH40-41. Los dos primeros asociados con el serotipo O25b:H4 y el último con el serotipo O16:H5 (Dahbi *et al.*, 2014).

A diferencia de la mayoría de las cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, que derivan principalmente de grupos filogenéticos A, B1 y D, el grupo B2-ST131 combina tanto genes de resistencia como genes de virulencia, algo que en las cepas clásicas ExPEC del grupo filogenético B2 había sido excluyente (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008).

El éxito del clon ST131 se debe en gran parte a la adquisición de genes de resistencia. Así, dos rasgos característicos de este clon fueron la resistencia a cefalosporinas de amplio espectro, debido a la producción de CTX-M-15, y la resistencia a fluoroquinolonas (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008; Coque *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos estudios mostraron una alta prevalencia de este clon entre aislados no productores de BLEE y resistentes a fluoroquinolonas (Johnson *et al.*, 2009a). Esto sugiere que las enzimas CTX-M podrían haber sido adquiridas por

aislados de *E. coli* ST131 que ya eran exitosos posiblemente por ser previamente resistentes a la familia de las fluoroquinolonas (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014).

Leflon-Guibout *et al.*, 2008 y Goldin *et al.*, 2012 realizaron estudios donde observaron la presencia de cepas de *E. coli* ST131 sin patrones de resistencias a antibióticos. Otros autores compararon los patrones de resistencia obtenidos en aislados de *E. coli* ST131 tanto BLEE como no BLEE en relación a aislados de *E. coli* no pertenecientes a este grupo clonal. Para aislados productores de BLEE, las cepas ST131 eran más frecuentemente resistentes a amikacina, amoxicilina-clavulánico, piperacilina-tazobactam o quinolonas y más frecuentemente sensibles a gentamicina o a cotrimoxazol que las cepas no ST131. Para aislados no productores de BLEE, las cepas ST131 eran más frecuentemente resistentes a quinolonas y a ampicilina/amoxicilina que las cepas no ST131 (Brisse *et al.*, 2012; Lopez-Cerero *et al.*, 2013).

La introducción y diseminación de este grupo clonal ha hecho cambiar rápidamente el panorama epidemiológico de cepas BLEE. No obstante, hay que tener en cuenta que menos del 10% de las cepas de este grupo clonal producen BLEE y que su presentación clínica más frecuente es en forma de resistencia a las fluoroquinolonas y sensibilidad a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Desde que en 2008 este clon fuera identificado en tres continentes, América, Europa y Asia han sido numerosas las publicaciones que reflejan el exitoso desarrollo del mismo distribuyéndose por todo el mundo como muestra la figura 12, y suponiendo en la actualidad en muchos países mas del 50% de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE causantes de infecciones urinarias y septicemias en seres humanos.



Figura 12. Diseminación global del grupo clonal *Escherichia coli* ST131. Las estrellas rojas indican aislados productores de enzimas BLEE y las azules indican aislados no BLEE pero resistentes a fluoroquinolonas. Nicolas-Chanoine *et al.*, 2014.

#### 1.5.1 *Escherichia coli* ST131 en animales de compañía

La primera cepa ST131 aislada en animales de compañía fue en un perro con infección del tracto urinario en Portugal, resultó ser resistente a las fluoroquinolonas y productora de CTX-M-15 (Pomba *et al.*, 2009). Este hallazgo fue interpretado como una posible transferencia de humanos a animales debido a la proximidad entre las mascotas y sus propietarios.

En Estados Unidos Johnson *et al.*, 2009b, aislaron una cepa ST131 no productora de BLEE y fluoroquinolonas resistente en un perro y dos gatos con infección del tracto urinario que vivían en la misma casa, indicando un posible intercambio entre los animales.

En un estudio donde se analizaron 177 muestras de varias especies animales, la mayoría gatos, perros y caballos con ITUs, heridas infectadas y diarrea procedentes de ocho países europeos (Alemania, Italia, Holanda, Francia, España, Dinamarca, Austria y Luxemburgo) encontraron una prevalencia de este clon del 5.6%. Todas las cepas ST131 eran productoras de CTX-M-15, salvo una que era productora de SHV-12, estas cepas fueron muy parecidas a cepas ST131-CTX-M-15 de origen humano (Ewers *et al.*, 2010).

En Japón, Harada *et al.*, 2012, aislaron en perros y gatos cepas ST131 productoras de CTX-M-27 en el 12% de las 33 muestras resistentes a cefalosporinas de primera generación. Albrechtova *et al.*, 2012 mostraron que los perros de pastores nómadas del norte de Kenia albergaban cepas de *E. coli* ST131 productoras de CTX-M-15 indicando una posible transferencia de humanos a animales.

### 1.5.2 *Escherichia coli* ST131 en animales de producción

La primera cepa O25b: H4-ST131 aislada a nivel mundial se detectó en el año 2003 en una muestra fecal de una granja de pollos de Cataluña. Se trataba de una cepa productora de CTX-M-9 que presentó un 81% de identidad en su perfil de PFGE con tres cepas de origen clínico humanas (Cortes *et al.*, 2010).

Posteriormente, Mora *et al.*, 2010 aislaron cepas de *E. coli* ST131 productoras de CTX-M-9 en aves de corral, estas muestras fueron recogidas en diferentes países en varios años. Así, tres (0.2%) de 1601 aislados de *E. coli* recogidos de aves enfermas de España, Francia y Bélgica entre los años 1991 y 2001 pertenecían al grupo clonal ST131, ninguna producía BLEE y dos eran resistentes a las quinolonas. Una (1.8%) de 57 muestras fecales de pollos sanos en España en el año 2003 fueron fluoroquinolonas sensibles, pertenecían al grupo clonal ST131 y eran productoras de CTX-M-9. Siete (1.5%) de 463 aislados de *E. coli* en pollos enfermos en España entre los años 2007 y 2009 fueron *E. coli* ST131, dos aislados producían CTX-M-9 y

eran susceptibles a fluoroquinolonas. Finalmente, en España, en siete (7%) muestras de carne de pollo de 100 muestras analizadas fue aislada *E. coli* ST131, tres de esos aislados eran resistentes a fluoroquinolonas y producían CTX-M-9. Algunas de las cepas aviares O25b:H4-ST131-CTX-M-9 aisladas en este estudio resultaron tener el mismo patrón de genes de virulencia que varias cepas clínicas humanas con las que presentaron también >90% de identidad en sus patrones de macrorrestricción.

Vincent *et al.*, 2010 encontraron un único aislado ST131 no BLEE entre 417 muestras de carne de pollo en Montreal en 2006. Este aislado era muy similar a aislados de origen humanos encontrados en ITU.

Giufre *et al.*, 2012 identificaron un aislado (0.9%) de *E. coli* ST131 de 101 muestras de pollos y pavos de engorde sanos. Por último Schink *et al.*, 2013 identificaron una cepa ST131 productora de CTX-M-1 procedente de un cerdo con diarrea entre 1378 cepas de *E. coli* de cerdos, aves y vacuno.

### 1.5.3 *Escherichia coli* ST131 en fauna silvestre

En Alemania, Guenther *et al.*, 2010b investigaron 220 cepas procedentes de ratas de alcantarilla (*Rattus norvegicus*) e identificaron una cepa ST131 productora de CTX-M-9. En Rusia, Hernandez *et al.*, 2010 encontraron entre 532 cepas de *E. coli* de gaviotas de Bering (*Larus glaucescens*) una cepa ST131 productora de BLEE. En Portugal, Simoes *et al.*, 2010 aislaron cuatro cepas *E. coli* ST131 productoras de BLEE en 45 aislados de gaviotas. Tausova *et al.*, 2012 también identificaron este tipo de cepas en heces de cormoranes (*Phalacrocorax carbo*).

Los últimos trabajos de investigación indican una alta heterogeneidad dentro del grupo clonal ST131, no solo en base al contenido de genes de virulencia, la variedad de enzimas BLEE que puede producir, los patrones de resistencia a antibióticos, los diferentes perfiles de electroforesis en campo pulsado (PFGE) y los diferentes



patrones de virulencia *in vivo*, sino también por las diferencias encontradas entre las cepas obtenidas de distintas fuentes (Johnson *et al.*, 2012; Matsumura *et al.*, 2012; Dhahi *et al.*, 2013; Vredenburg *et al.*, 2014).

### **1.6 Resistencias a los antibióticos. Un problema de salud pública**

El empleo excesivo de antibióticos o su mal uso se ha vinculado a la aparición y difusión de microorganismos resistentes dando lugar a tratamientos ineficaces que suponen un grave riesgo para la salud pública, sobre todo cuando estas resistencias afectan a bacterias causantes de zoonosis. Así, más de 25.000 personas mueren al año en Europa como consecuencia de infecciones por bacterias multiresistentes para las que ya no existe un antibiótico eficaz, generando un gasto de 1.500 millones de euros en concepto de asistencia sanitaria y pérdida de productividad (Comunicación de la Comisión 2015/C 299/04). Varios organismos internacionales han tomado conciencia sobre el problema y han propuesto una serie de actuaciones.

La Asamblea Mundial de la Salud, el mayor órgano decisorio de política sanitaria perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), en mayo de 2015, adoptó en su 68ª asamblea un Plan de acción para luchar contra la resistencia a antimicrobianos (RAM). Este plan establece cinco objetivos, mejorar la conciencia y el conocimiento sobre la resistencia a antimicrobianos, reforzar la vigilancia y la investigación, reducir la incidencia de la infección, optimizar el uso de antimicrobianos y asegurar una financiación duradera. En esta misma resolución se insta a los Estados a implementar el plan de acción en sus propios contextos nacionales antes de mayo de 2017 y a buscar fuentes de financiación adicionales. Los programas nacionales tienen que tener una estructura holística y abarcar tanto la salud humana como animal y el uso en agricultura y en la industria. Es necesario establecer medidas para evitar volver a la denominada “era post-antibióticos”, en la



que enfermedades comunes y heridas menores tratables por décadas pueden empezar nuevamente a ser fatales.

Uno de los principales problemas es que en muchos países es posible la venta de antibióticos sin prescripción médica, que junto con la venta de medicamentos por internet, facilita que las personas puedan tener acceso a medicamentos que no podrían comprar en una farmacia sin receta médica. Otro factor que incrementa la incidencia de la resistencia es que el tratamiento no sea completado.

La mayoría de los antimicrobianos utilizados en el mundo no son administrados a pacientes, sino a los animales destinados a la producción de alimentos. En los animales, los antimicrobianos se utilizan como tratamiento clínico, como profilaxis, metafilaxis o como promotores del crecimiento con el fin de obtener animales de mayor tamaño con la misma inversión y la misma cantidad de alimentos. Este último uso está prohibido en Europa desde el año 2006 (Muñoz & Porrero, 2016).

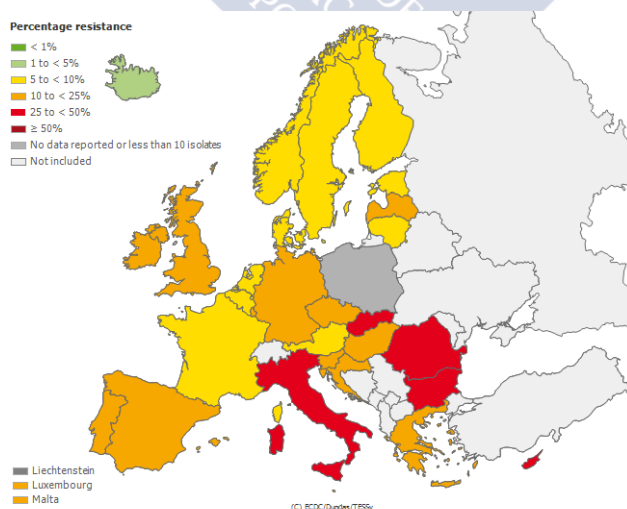
Igualmente, en la conferencia mundial de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) sobre el uso responsable y prudente de los agentes antimicrobianos en los animales, celebrada el 13 de marzo de 2013 en París, se recomendó que esta organización empezara a monitorizar el uso de antibióticos, proyecto que se inició en el año 2015.

En mayo de 2016, en la 84ª Asamblea General de la OIE se adoptó por unanimidad la Resolución número 36, que otorga a la OIE el mandato de consolidar las acciones para combatir la resistencia a los antimicrobianos en una estrategia única publicada en noviembre del mismo año. La OIE ha evaluado y afrontado este problema en su código terrestre y código sobre salud animal en acuicultura. Estos códigos desarrollan programas armonizados para la vigilancia de resistencias a nivel nacional y la monitorización del consumo de antibióticos en animales productores de alimentos. También regulan las responsabilidades de la industria farmacéutica,

fabricantes de piensos, industria transformadora de alimentos de origen animal y profesionales veterinarios, y establece una guía para realizar un análisis de riesgo sobre el uso de antibióticos en animales.

El *Codex Alimentarius* fue fundado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS con el objetivo de desarrollar estándares de seguridad alimentaria que permitieran el control y seguimiento de los alimentos. Se ha desarrollado el llamado código de prácticas para minimizar y contener la resistencia a antimicrobianos y la guía para realizar el análisis de riesgos de estas resistencias transmitidas por los alimentos, ambos integrados en un documento publicado en el año 2015.

También, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), agencia encargada de informar y alertar de todos aquellos problemas que afecten a la seguridad alimentaria, lleva años proporcionando trabajos científicos independientes y asesorando sobre los riesgos de la transferencia de resistencias microbianas en la cadena alimentaria entre animales y humanos (Figura 13).



**Figura 13. Porcentajes de resistencias de *E. coli* a cefalosporinas de tercera generación. 2014;**  
<http://ecdc.europa.eu>.

La EFSA monitoriza la situación de las resistencias a los antimicrobianos en los animales y la alimentación en toda Europa, colaborando estrechamente con la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y con el Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades (ECDC). También tiene representación en la Organización Mundial para la Salud (OMS) y en la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Cada año publica un informe sobre zoonosis, enfermedades transmitidas por alimentos y resistencias antimicrobianas en Europa. También publica estudios de referencia sobre la prevalencia de resistencias en poblaciones específicas de animales y proporciona guías a las autoridades nacionales sobre cómo llevar a cabo su monitorización y la presentación de informes (Tabla 6).

**Tabla 6. Porcentajes de resistencias de E.coli a determinados antibióticos en la especie Gallus gallus en 2013. EFSA, 2015.**

Country	Ampicillin		Cefotaxime		Chloramphenicol		Ciprofloxacin		Gentamicin		Nalidixic acid		Streptomycin		Sulfonamides		Tetracyclines	
	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res	N	% Res
<b>All Gallus gallus</b>																		
Austria	146	38.4	146	2.1	146	5.5	146	65.1	146	2.1	146	62.3	146	34.9	146	38.4	146	22.6
Belgium	234	84.6	234	10.3	234	32.5	234	74.8	234	5.1	234	70.5	234	73.9	234	69.7	234	60.3
Croatia	150	63.3	150	18.0	150	14.7	150	88.7	150	4.0	150	85.3	150	53.3	150	61.3	150	56.0
Denmark	125	25.6	125	0.8	125	0	125	6.4	125	0	125	3.2	125	8.0	125	26.4	125	15.2
France	193	57.5	193	6.2	193	6.7	193	42.5	193	1.0	193	42.0	193	36.8	193	49.2	193	65.8
Germany	599	58.1	599	5.0	599	18.7	599	47.7	599	8.3	599	45.7	599	54.4	599	52.3	599	35.2
Hungary	152	44.1	152	6.6	152	9.9	152	68.4	152	2.0	152	63.2	152	23.7	152	33.6	152	37.5
Netherlands	494	42.5	494	2.6	494	10.1	494	42.1	494	4.7	494	41.5	494	45.1	494	37.9	494	35.8
Poland	343	59.2	343	5.2	343	16.0	319	62.7	343	5.0	343	53.4	343	33.5	245	21.2	343	46.1
Spain	170	70.0	170	15.9	170	15.3	170	83.5	170	30.6	170	81.2	170	62.9	170	50.6	170	64.1
<b>Total (MSs 10)</b>	<b>2,606</b>	<b>55.2</b>	<b>2,606</b>	<b>6.3</b>	<b>2,606</b>	<b>14.5</b>	<b>2,582</b>	<b>55.5</b>	<b>2,606</b>	<b>6.4</b>	<b>2,606</b>	<b>52.4</b>	<b>2,606</b>	<b>45.7</b>	<b>2,508</b>	<b>45.0</b>	<b>2,606</b>	<b>42.8</b>
Norway	186	9.1	186	0	186	0.5	186	0.5	186	2.2	186	0.5	–	–	186	11.3	186	7.0
Switzerland	189	25.4	189	0.5	189	1.1	189	35.4	189	0.5	189	34.4	189	15.3	189	27.0	189	23.8
<b>Broilers</b>																		
Austria	146	38.4	146	2.1	146	5.5	146	65.1	146	2.1	146	62.3	146	34.9	146	38.4	146	22.6
Belgium	232	85.3	232	10.3	232	32.8	232	75.4	232	5.2	232	71.1	232	74.6	232	70.3	232	60.8
Croatia	150	63.3	150	18.0	150	14.7	150	88.7	150	4.0	150	85.3	150	53.3	150	61.3	150	56.0
Denmark	125	25.6	125	0.8	125	0	125	6.4	125	0	125	3.2	125	8.0	125	26.4	125	15.2
France	193	57.5	193	6.2	193	6.7	193	42.5	193	1.0	193	42.0	193	36.8	193	49.2	193	65.8
Germany	434	69.8	434	5.1	434	25.3	434	53.5	434	11.1	434	51.4	434	70.0	434	67.3	434	41.7
Hungary	152	44.1	152	6.6	152	9.9	152	68.4	152	2.0	152	63.2	152	23.7	152	33.6	152	37.5
Netherlands	494	42.5	494	2.6	494	10.1	494	42.1	494	4.7	494	41.5	494	45.1	494	37.9	494	35.8
Poland	172	80.8	172	5.8	172	23.3	148	85.8	172	7.6	172	73.3	172	50.6	74	0	172	61.6
Spain	170	70.0	170	15.9	170	15.3	170	83.5	170	30.6	170	81.2	170	62.9	170	50.6	170	64.1
<b>Total (MSs 10)</b>	<b>2,268</b>	<b>58.6</b>	<b>2,268</b>	<b>6.6</b>	<b>2,268</b>	<b>15.9</b>	<b>2,244</b>	<b>58.2</b>	<b>2,268</b>	<b>7.1</b>	<b>2,268</b>	<b>55.4</b>	<b>2,268</b>	<b>50.4</b>	<b>2,170</b>	<b>48.6</b>	<b>2,268</b>	<b>45.6</b>
Switzerland	189	25.4	189	0.5	189	1.1	189	35.4	189	0.5	189	34.4	189	15.3	189	27.0	189	23.8
<b>Laying hens</b>																		
Poland	171	37.4	171	4.7	171	8.8	171	42.7	171	2.3	171	33.3	171	16.4	171	30.4	171	30.4
Norway	186	9.1	186	0	186	0.5	186	0.5	186	2.2	186	0.5	–	–	186	11.3	186	7.0

MSs: Member States; N: number of isolates tested; % Res: percentage of resistant isolates; –: no data reported.

La Unión Europea (UE) tiene como una de sus principales prioridades la de combatir la resistencia a los antibióticos y ha identificado la necesidad de establecer una estrategia común europea.

En 1998 durante la conferencia “The Microbial threat”, en Copenhague, se inició un proceso para tomar conciencia sobre las consecuencias causadas por el mal uso de los antibióticos, al año siguiente se publicó el dictamen del Comité Científico, concluyendo la urgencia para tomar decisiones de inmediato para reducir el uso de antibióticos; este mismo año se iniciaron los primeros proyectos de investigación financiados por la UE. En el año 2001 se publicó la primera estrategia de la UE en materia de resistencia a antimicrobianos lo que incluyó la eliminación gradual de antibióticos para uso no terapéutico en animales, así, en el año 2006 queda prohibido el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal (Reglamento (CE) N° 1831/2003). También se empezó a trabajar en colaboración con Estados Unidos en la cumbre UE-USA llamada TATFAR (Transatlantic Task Force on Antimicrobial Resistance).

En el año 2009, se encarga a la Comisión la tarea de presentar un Plan de Acción en 18 meses, así, el 17 de noviembre de 2011 el Parlamento Europeo publicó una resolución no legislativa, por la que se establece un Plan Director de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas en Europa, con una duración de cinco años, con siete áreas clave de actuación y 12 acciones paralelas en humana/veterinaria como muestra la figura 14 (Muñoz & Porrero, 2016).



Figura 14. Acciones que se establecen en el Plan Director de Acción sobre Resistencias Antimicrobianas en Europa (Muñoz & Porrero, 2016).

Las siete áreas de actuación que plantea este plan son el uso apropiado de antibióticos, tanto en humana como en veterinaria, la prevención de infecciones microbianas y su propagación, desarrollo de nuevos antibióticos o tratamientos alternativos, mejorar los sistemas de monitorización y vigilancia, cooperación internacional, promoción de la investigación e innovación y finalmente, comunicación, educación y formación de todos los sectores implicados.

El 29 de mayo de 2012, el Consejo de la Unión Europea publicó un documento de conclusiones sobre el impacto de las resistencias a antimicrobianos desde la perspectiva tanto de la salud humana como veterinaria. En el punto 29 de este documento se exhorta a los EEMMs para que desarrollen e implementen a nivel nacional, estrategias o planes de acción para contener el desarrollo de las resistencias. Así, la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) inicia en el año 2012, la elaboración de un plan nacional estratégico y de acción (PRAN) para reducir el uso de antibióticos y preservar de manera sostenible el arsenal terapéutico existente. Este plan fue aprobado en el año 2014, tiene una

duración inicial hasta el 2018, siendo esencial la implicación de todos los estamentos para su realización.

En el PRAN se proponen seis líneas estratégicas, comunes para la salud humana y veterinaria:

1. Vigilancia del consumo de antibióticos y las resistencias microbianas.
2. Controlar las resistencias bacterianas.
3. Identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención y tratamiento.
4. Definir las prioridades en materia de investigación.
5. Formación e información a los profesionales sanitarios.
6. Comunicación y sensibilización de la población en su conjunto y de subgrupos de población.

Toda esta normativa no se hubiera desarrollado sin la intervención de investigadores que ayudados por una fuerte demanda social, fueron advirtiendo de los riesgos del uso indiscriminado de antibióticos en la sanidad humana y animal. En este sentido, desde hace años vienen apareciendo noticias en los medios de comunicación alertando sobre el peligro de la mala utilización de los antibióticos, sobre todo relacionados con la producción animal, lo que también está produciendo que algunas empresas productoras de alimentos de origen animal hagan propaganda sobre la utilización responsable de los antibióticos (Figura 15).



# 1 El uso indiscriminado de antibióticos en animales es peligroso para los seres humanos

2 Uno de los mayores logros de la medicina puede convertirse en un enemigo de la salud de las personas



VIDA MODERNA | 2015/03/05 15:01

¿Cuáles son los riesgos de consumir pollo con antibióticos?

La cadena McDonald's acaba de anunciar que en Estados Unidos dejará de servir pollo tratado con antibióticos. Pero ¿qué tan importante es esto para la salud pública?



NOTICIAS GASTRONÓMICAS

## McDonald's anuncia que se abastecerá de pollos criados sin antibióticos

McDonald's ha anunciado un cambio de política y explica que tiene la intención de abastecer de pollos criados sin antibióticos en el plazo de dos años, tiempo que necesita para esta transición. Se trata de una promesa que genera desconfianza ya que anteriormente hizo promesas similares que no ha cumplido.

2015-03-05

# 1 Paremos la crueldad animal y salvemos vidas

FORMA LA PRECISIÓN

2 A los ministros de Agricultura y Sanidad de la UE:

Como ciudadanos preocupados por el bienestar animal y la amenaza que se cierne sobre la salud pública con las superbacterias, les exigimos que se pongan de acuerdo en un marco regulatorio fuerte para prohibir el uso preventivo de antibióticos en el ámbito de la ganadería, y que implementen mecanismos sólidos para que tanto veterinarios como empresas de alimentación y ganaderías cumplan con estas leyes. Su liderazgo puede reducir el sufrimiento animal y salvar vidas humanas.



Las crías de cerdos industriales están sobrecargadas de antibióticos a animales

Antimicrobial resistance - why the irresponsible use of antibiotics in agriculture must stop

A briefing from the Alliance to Save Our Antibiotics



Alertan de que, igual que en los humanos, su mal uso provoca que las bacterias sean inmunes a los fármacos

## LOS VETERINARIOS PIDEN A LOS DUEÑOS DE MASCOTAS QUE USEN BIEN LOS ANTIBIÓTICOS

El Colegio Oficial de Veterinarios de Baleares (Covib) ha iniciado una campaña informativa para concienciar sobre el suministro correcto de los antibióticos a los animales: "Antibióticos, los justos y necesarios", según informa EFE. Para la iniciativa, impulsada por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (Aemps) y el Consejo General de Colegios Veterinarios de España (Colvet), se han editado dípticos y carteles. El Covib enviará el material editado a sus casi 600 colegiados. En Baleares hay 172 centros veterinarios (3 hospitales, 129 clínicas y 409 consultorios) y hay censadas 325.330 mascotas en el Registro de Identificación de Animales de Compañía de Baleares, la mayoría de los cuales son perros, que son mascotas de identificación obligatoria. La campaña muestra la importancia que tienen los antibióticos en la medicina moderna, explica cuáles son los efectos de su mal uso, hace hincapié en la capacidad de resistencia de las bacterias a la acción de los antibióticos y ofrece consejos para luchar contra ella. El colegio explica que los antibióticos tienen una importancia capital en la medicina moderna desde que se empezaron a emplear en los años 40 del siglo pasado. Sin embargo, recuerda que un uso abusivo ha dado lugar al desarrollo de bacterias que no responden a unos tratamientos que antes eran eficaces, algo que pasa tanto en la medicina humana como en la animal. Por ello, la Aemps y el Colvet, presidido por Juan José Badiola, han puesto en marcha este verano esta campaña informativa en todo el Estado. La campaña lanza un mensaje a la ciudadanía de que el veterinario es el único que puede decidir y prescribir el antibiótico adecuado, siempre en función del examen clínico y de las analíticas, y también alerta del peligro que puede implicar no hacerlo. Pide a los dueños de animales de compañía un respeto riguroso de las dosis, su duración y el modo de administración del tratamiento para conseguir un resultado óptimo.

INFORMACIÓN VETERINARIA | 39

Figura 15. Distintos artículos en prensa aconsejando un uso racional de los antibióticos.

Aunque hay que investigar más sobre este tema, cada vez son mayores las evidencias de que los animales de producción pueden ser un reservóreo de genes de resistencia en infecciones humanas.

Desde que el libre comercio se estableció entre los estados miembros de la UE, hay una necesidad de monitorizar la resistencia a los antimicrobianos y de implementar políticas comunes en su uso. La armonización entre los programas de los diferentes países y la recolección de datos segregados por especies animales es esencial para obtener una visión global real de la presencia y tendencia de las resistencias antimicrobianas, así como para establecer estrategias de intervención para minimizar la aparición de resistencias (García-Migura *et al.*, 2014).

## **1.7 El sector avícola en España**

### **1.7.1 Organización general del sector avícola**

El sector avícola se caracteriza, en sus modelos más industrializados, por un elevado nivel tecnológico y un complejo sistema productivo y comercial, lo que hace de la avicultura, sobre todo en el subsector carne, el más claro exponente de los sistemas de producción de ganadería intensiva.

Otra de las características fundamentales del sector es la enorme especialización de todos aquellos eslabones que componen la cadena productiva (tanto en la obtención de carne como en la de huevos de consumo) y en la que existe una organización piramidal que consta de diferentes niveles:

Nivel 1: Bisabuelas o granjas de selección. Este nivel está monopolizado por poco más de 20 empresas en todo el mundo (en USA, Francia, Alemania, Israel, Gran Bretaña y Holanda). Estas empresas, una vez fijadas las diversas “líneas útiles de bisabuelas” (procedentes de la realización de apareamientos consanguíneos a partir de unos “pools genéticos iniciales”), proceden a efectuar los cruces de estas



líneas entre sí y a seleccionar los productos obtenidos, estableciendo así las “líneas comerciales de abuelas y abuelos”.

Nivel 2: Abuelas o granjas de multiplicación. Este nivel se basa en el establecimiento de abuelas, generalmente en el país de destino, a partir de la multiplicación de las poblaciones de abuelas y abuelos de 1 día importados de los países de origen donde fueron establecidas. Este nivel constituye el punto de arranque de las empresas avícolas españolas.

Nivel 3: Madres (reproductoras) o granjas de producción. A partir de los abuelos/as se obtienen los reproductores (nivel madres) y son éstos los que dan lugar a los huevos fecundados que, una vez incubados, originan los pollitos de 1 día. Aunque el proceso descrito hasta este tercer nivel es esencialmente el mismo, las estirpes y líneas genéticas son distintas según que la orientación productiva sea la obtención de carne o de huevos para consumo.

Nivel 4: En el caso de producción de carne los pollitos de un día (machos y hembras) resultantes de la incubación de huevos fértiles son engordados en los cebaderos en donde se obtiene el pollo de carne o broiler, que es el producto final que se desea obtener. En el caso de la producción de huevos, los pollitos y pollitas recién eclosionados (de estirpes genéticas de aptitud puesta) son sexados, aprovechándose únicamente las hembras, futuras ponedoras comerciales. Es preciso proceder a su cría y recría antes de poder disponer de animales en producción comercial.

Todos los niveles del proceso productivo están íntimamente relacionados, formando una cadena de producción (Figura 16). Por eso, normalmente se organizan bajo una misma responsabilidad empresarial dando lugar a las integraciones. La principal ventaja de una organización piramidal es que permite mejorar la planificación en materia sanitaria, productiva y comercial. Sin embargo, el flujo vertical de animales

y la alta capacidad reproductiva de las aves, implica que cualquier error, especialmente en los niveles superiores, se extienda rápidamente a las explotaciones situadas en la base ocasionando enormes pérdidas económicas.

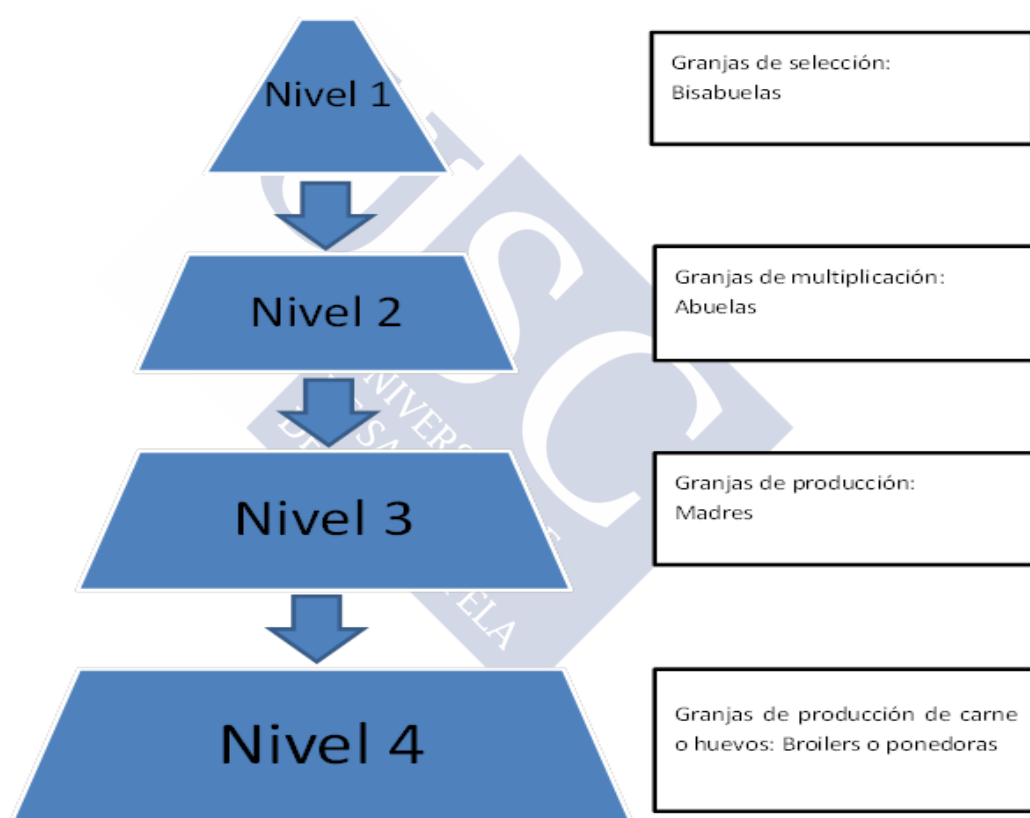
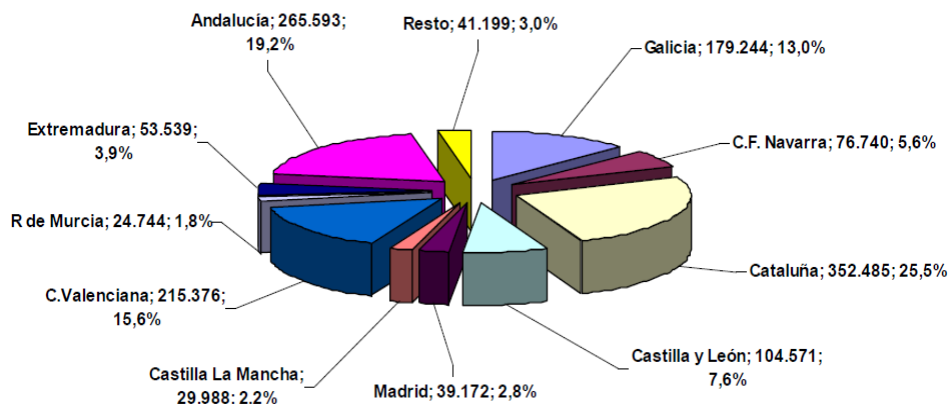


Figura 16. Esquema piramidal en la producción avícola.

### 1.7.2 Datos de producción del sector avícola en España

En el año 2012, según la Subdirección General de Estadística del MAGRAMA, la producción de aves para carne en España supone el 5,8% de la producción final agraria y un 15,3% de la producción final ganadera. El censo medio de reproductoras de carne (madres de los broilers) en 2012 se estima en 4.280.000 aves, y el censo total de aves en producción (enviadas a matadero durante el año 2012) fue de 690.036 millones de aves. La mayor parte de la producción de carne de pollo se concentra en cuatro comunidades autónomas: Cataluña con 28,7% del total nacional, la Comunidad Valenciana con un 16,9% del total, Andalucía con un 15,8%, y Galicia con un 13,1%. La producción de pavo, segunda en importancia económica de nuestro país, se estima en torno a 116.000 T.



**Figura 17. Distribución de la producción de carne de aves por CCAA en el año 2012 (T: toneladas).**  
**Fuente S.G. Estadística MAGRAMA.**

Con un 11,8% de la producción total de carne de pollo, España es el segundo productor europeo de carne de pollo por detrás del Reino Unido. A nivel mundial, el principal productor es EEUU, aunque el mercado mundial está dominado por Brasil,

que destina mayor cantidad de producto a la exportación, mientras que la UE ocupa el cuarto lugar de la producción mundial con un 12,4% del total.

En el caso de la producción de huevos, en 2012 la avicultura de puesta representó el 3,1% de la producción final agraria y el 8,1% de la producción final ganadera. El censo de gallinas ponedoras fue de 46,78 millones de animales con una producción de 1.026.200 miles de docenas. La mayor producción de huevos a nivel estatal se concentra en las dos Castillas. Por una parte Castilla la Mancha con un 25,7 % del total y Castilla León con el 19%. En menor medida, se encuentran Cataluña (9,6%), Aragón (9,2%), Comunidad Valenciana (8,9%), Andalucía (6,4%) y Galicia (4,9%).

En el 2012 España alcanzó el mismo nivel que Francia, contando ambas con un 12,1% de la producción de huevos comunitaria. Seguidas de Alemania (11,8%), Reino Unido e Italia (10,1%), Polonia (9,2%) y Holanda con un 9% (Anuario Agrario 2013 COAG).

### 1.7.3 *El sector avícola en Galicia*

El sector avícola gallego supuso en el año 2011 un 17% de la producción final ganadera en Galicia, del que el 13% correspondió a la producción de huevos y el 4% a la producción de carne. Esta última representa el 33% de la producción de carne en Galicia (Figura 18).

De las 1069 explotaciones de aves existentes en Galicia en 2011, más del 85% eran de la especie *Gallus gallus*, el 8% era de pavos de engorde y el 7% restante correspondía a otras especies.

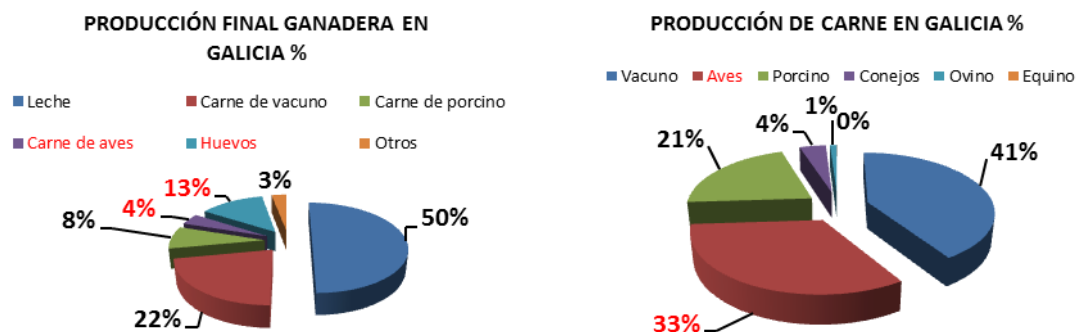


Figura 18. Porcentajes de la producción de aves en Galicia comparadas con otras producciones ganaderas.

La distribución de granjas de carne por provincias se concentra en Pontevedra y Ourense seguidas a distancia por Lugo y A Coruña. Sin embargo en granjas de producción de huevos el mayor número se concentra en A Coruña, con más del doble de granjas que el resto de las provincias (Álvarez, 2011).

#### 1.7.4 Plan sanitario avícola

Las explotaciones avícolas se encuentran reguladas, desde el punto de vista sanitario, por diversas disposiciones que incorporan directivas comunitarias y en particular por el Real Decreto 1888/2000, de 22 de noviembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar procedentes de países terceros; el Real Decreto 2087/1994, de 20 de octubre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción y comercialización de carnes frescas de aves de corral; el Real Decreto 556/1998, de 2 de abril, modificado por el RD 2297/2004, de 10 de diciembre, por el que se establecen las normas para expedir la certificación de animales y productos animales exigida por la normativa veterinaria, y el Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los

agentes zoonóticos. El anexo I de este RD recoge entre otros la bacteria *E. coli* verotoxigénica como agente zoonótico que debe ser objeto de vigilancia.

Además del cumplimiento de esta normativa, está establecido con carácter básico un plan sanitario de las explotaciones avícolas en todo el territorio nacional en el que se contemplan todas las fases, desde la instalación de una explotación, pasando por su funcionamiento, hasta el transporte de los animales, siempre bajo la óptica de unos controles que permiten asegurar el debido estado sanitario de las explotaciones y, por ende, de las aves de corral, tanto si se destinan al consumo humano, a la reproducción, o a la producción de huevos. Esta regulación se rige por el RD 328/2003, por el que se establece y regula el plan sanitario avícola. Así, la granja tiene que contar con un veterinario responsable de la explotación que redacte y se encargue de implementar el programa sanitario que aplicará en la misma. Entre otras actuaciones, el plan recogerá el cumplimiento de los planes de vigilancia y controles oficiales de enfermedades, así como las indicaciones establecidas en cada momento por las autoridades competentes.

Los veterinarios según este RD tienen la obligación de comunicar anualmente las enfermedades de declaración obligatoria como son: bronquitis infecciosa aviar, bursitis infecciosa (enfermedad de Gumboro), clamidiosis aviar, cólera aviar, enfermedad de Marek, laringotraqueitis infecciosa aviar, micoplasmosis (*M. gallisepticum*), pullorosis (*Salmonella pullorum*), tifosis aviar (*Salmonella gallinarum*) y viruela aviar. Además, deben establecer un programa sanitario encaminado al control de los procesos infecto-contagiosos y parasitarios de la granja.

Así mismo, será obligatorio un programa sanitario de control específico de *Salmonella* recogido en el Plan Nacional para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella* en manadas de gallinas ponedoras, reproductoras y broilers de la especie *Gallus gallus* y en pavos reproductores y de engorde. La salmonelosis

en España, al igual que en toda la Unión Europea es una de las principales zoonosis de transmisión alimentaria. En producción avícola, tras la introducción en los años 60 del método americano de explotación de las aves, la patología específica de salmonelosis aviar estuvo causada por *Salmonella pullorum* y *Salmonella gallinarum*. La erradicación de estos dos serotipos supuso la aparición, a partir de los años 80, de una nueva infección que se inició principalmente en manadas de reproductoras de la línea de producción de carne, causada por *Salmonella enteritidis*. Posteriormente este serotipo ha sido aislado también en reproductoras de la línea de producción de huevos, en manadas de gallinas ponedoras y en pollos de carne.

La vigilancia y control de *Salmonella* en España se lleva a cabo desde 1993, de acuerdo con la Directiva 92/117/CEE, del Consejo, actualmente derogada por la Directiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, con el fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos. Esta vigilancia y control han estado centrados en *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*.

En base a los datos obtenidos, el objetivo de reducción de la prevalencia contemplado en el Reglamento (CE) N° 2160/2003 en el cual está basado el presente Programa Nacional, se centra en los cinco serotipos más frecuentes de la salmonelosis en el hombre (Typhimurium incluida la cepa monofásica, Enteritidis, Infantis, Hadar y Virchow).

En las explotaciones en las que el destino del producto sea el comercio intracomunitario, además de *Salmonella*, también se realizará control de *Mycoplasma gallisepticum*, influenza aviar y enfermedad de Newcastle.

El resto de aves de corral distintas de la especie *Gallus gallus* se controlarán con la misma sistemática seguida para éstas, salvo en el caso del pavo, para el que los

controles establecidos en aves reproductoras, incubadoras y matadero se extienden también al control de *M. meleagridis* y *S. arizonae*.

De lo establecido en los planes nacionales, el plan sanitario recogerá las indicaciones de las autoridades competentes en la materia o los programas de la AD SG en la que, en su caso, se integre la granja. En el caso de Galicia, estos programas se recogen anualmente en la Orden de ayudas correspondiente al año en curso.

### **1.8 *Uso de antimicrobianos en producción animal***

Los sistemas de producción animal con alta densidad o con bioseguridad escasa, favorecen el desarrollo y la propagación de enfermedades infecciosas lo que conduce, con mayor frecuencia, a la utilización de tratamientos antimicrobianos para su tratamiento y prevención. Esto proporciona condiciones favorables para la selección, propagación y persistencia de bacterias resistentes a los antimicrobianos (EMA, 2006).

La propiedad de los antibióticos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde finales de los años cuarenta, cuando se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens*, donde se encontraban residuos de clortetraciclina, mejoraban su desarrollo. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antibióticos y para diversas especies animales. Los antibióticos como promotores de crecimiento se han empleado a dosis subterapéuticas durante largos períodos de la vida del animal, produciendo una ganancia de peso estimada alrededor del 5%. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud. Básicamente actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Actúan también reduciendo la flora normal que compite con el



hospedador por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales.

Desde la década de los cincuenta, la adición de antibióticos en pequeñas dosis al pienso de los animales de abasto ha sido una práctica habitual para mejorar las producciones. En aquel tiempo no se tuvo en cuenta el efecto que el consumo de estos “factores nutritivos”, como se les consideraba en un principio, pudiera tener sobre la resistencia bacteriana. A finales de los años sesenta surgieron las primeras voces de preocupación sobre el incremento de la resistencia y la posible relación con el consumo de estos promotores. En 1969 se publicó el informe británico Swann, donde se alertaba del posible riesgo de selección de bacterias resistentes en animales que pudieran posteriormente pasar al ser humano. Dicho informe recomendaba que no se utilizasen como promotores de crecimiento antibióticos que pudieran también emplearse en medicina humana, o antibióticos que seleccionasen resistencias cruzadas.

En 1970, en la entonces CEE, se publicó la Directiva 70/524 sobre los aditivos en la alimentación animal. Solamente podrían ser empleados como promotores aquellos antibióticos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, que fueran activos frente a bacterias grampositivas y que no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en la carne. Se decidió eliminar como promotores aquellos antibióticos que también fueran utilizados en la medicina humana o animal. De este modo, se prohibía en Europa el empleo de tetraciclinas o  $\beta$ -lactámicos como promotores del crecimiento en el pienso de animales. Esta lista publicada en la Directiva europea ha variado en el tiempo. Los antibióticos que se han empleado en los últimos años en la UE como promotores del crecimiento animal han sido los siguientes: avoparcina, tilosina, espiamicina, virginamicina, bacitracina, avilamicina, flavofosfolipol, monensina y salinomicina. De esta lista han ido suprimiéndose paulatinamente, así en abril de 1997 la UE dictó la prohibición

cautelar de la avoparcina como promotor del crecimiento animal en todos los países miembros, debido a la presencia de cepas de *Enterococcus* con resistencia de alto nivel a la vancomicina, tanto en muestras de alimentos como en aguas residuales y heces de humanos y de animales sanos, sin embargo este tipo de cepas no se encontraron en muestras clínicas. Con anterioridad a esta fecha, diversos países se adelantaron a la decisión europea prohibiendo el uso de la avoparcina en su territorio: Dinamarca en 1995, Alemania en 1996 y Suecia en 1986 que prohibió el uso de todos los antibióticos como promotores del crecimiento. Durante los años 1997 y 1998 tuvieron lugar numerosas reuniones científicas promovidas por la OMS y la UE para evaluar el impacto de los restantes antibióticos utilizados como promotores del crecimiento en la selección y diseminación de cepas con resistencia a antibióticos de importancia en humanos. La UE decidió en 1999 prohibir el uso de los antibióticos espiramicina, tilosina, virginiamicina y bacitracina, y continuar con la prohibición de la avoparcina (Torres & Zarazaga, 2002). Finalmente los países de la unión Europea abandonaron el uso de estos agentes en alimentación animal desde el 1 de enero de 2006 (Reglamento (CE) N° 1831/2003), permitiéndose exclusivamente su uso terapéutico.

Sin embargo, la retirada de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento en lugar de disminuir su cantidad, ha provocado un efecto rebote, los datos disponibles indican que en los primeros años tras su prohibición como promotores del crecimiento el consumo de agentes antimicrobianos para terapia clínica fue considerable e incluso superior al consumo en humanos. Aún así, los datos de la Agencia Europea del Medicamento en 2012 indicaban que 20 países de los 26 estudiados redujeron un 15% el consumo de antibióticos entre los años 2010 y 2012. (EMA, 2012).

La red de vigilancia del consumo de antibióticos ESVAC (*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*) se inició en el año 2009, después de que la

Comisión requiriera a los EEMM en el punto 21 del documento *Council Conclusions on Antimicrobial Resistance, 2008*, el fortalecimiento de los sistemas de vigilancia y la mejora de la calidad de los datos de resistencias y del uso de agentes antimicrobianos tanto en la salud humana como en el sector veterinario. El proyecto está coordinado por la EMA y cada EEMM debe aportar de forma anual, los datos de ventas y consumo de antibióticos de sus respectivos territorios. Desde la EMA el objetivo es coordinar los datos, validarlos y analizarlos, y cada año se publica un informe con los hallazgos y datos más relevantes (ESVAC, 2015).

España participa en este proyecto aportando datos de ventas obtenido hasta ahora de los laboratorios farmacéuticos que los aportan voluntariamente, ya que no existe base legal que permita pedir estos datos. Sin embargo, en la Ley 29/2006, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, en su capítulo V sobre la trazabilidad de los medicamentos se establece que los distribuidores sí tienen obligación legal de aportar estos datos. Por ello, desde el año 2014 se han incorporado al proyecto, con el fin de obtener datos más próximos al consumidor final.

Los datos de consumo de antimicrobianos en España incluidos en el proyecto ESVAC, desvela que el consumo de cefalosporinas ha disminuido desde 2010 donde era muy alto, estabilizándose durante 2011, 2012 y 2013. El consumo de fluoroquinolonas sigue siendo elevado a través del periodo de tiempo considerado en relación con los países de la UE. (Figuras 19, 20 y 21).

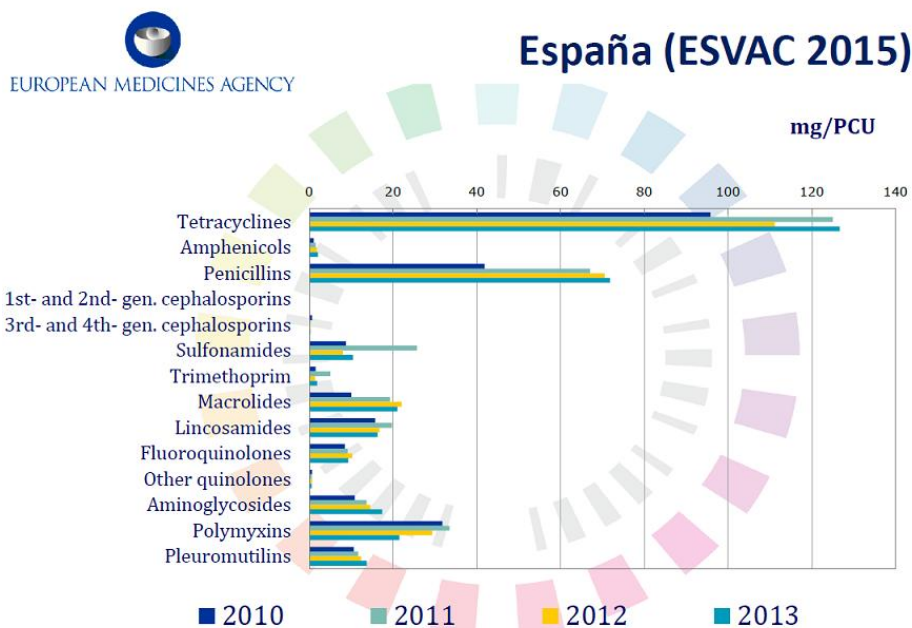


Figura 19. Consumo de antibióticos en veterinaria en España durante los años 2010 a 2013. EMA, 2015.

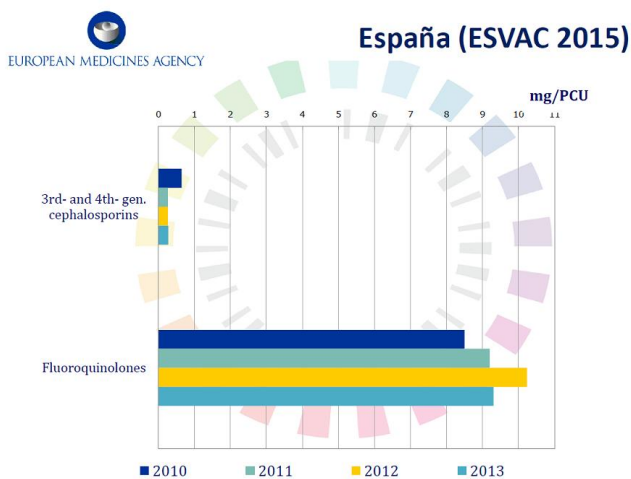
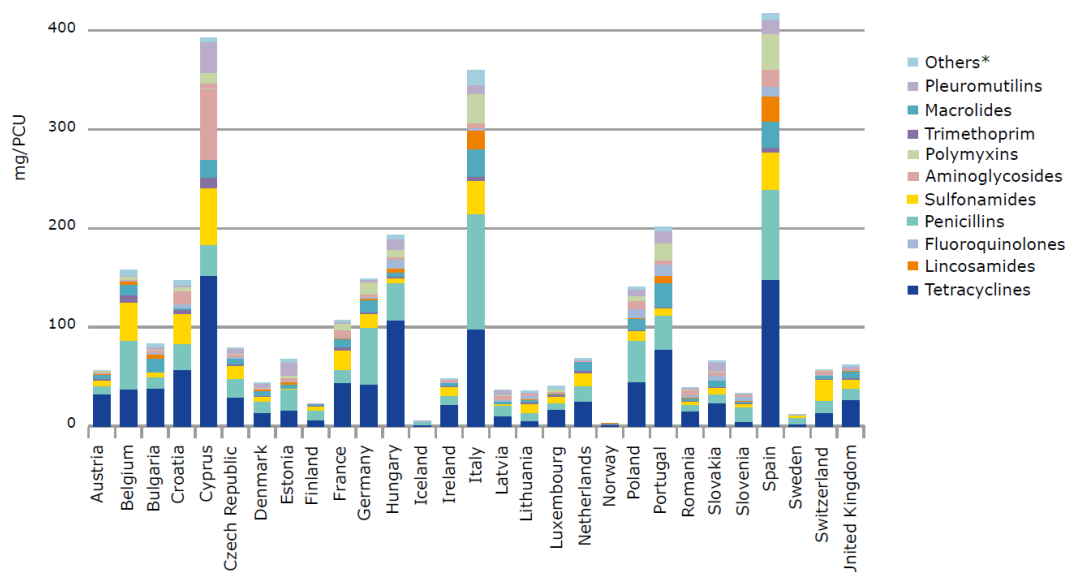


Figura 20. Consumo de cefalosporinas y fluoroquinonas en veterinaria en España durante los años 2010 a 2013. EMA, 2015.



**Figura 21. Ventas de antibióticos para uso animal en 29 países en 2014. El informe sitúa a España a la cabeza del consumo con 418,8 mg/PCU (unidad de corrección de la población), lo que supone un incremento del 25% desde 2011. EMA 2016.**

Las resistencias existentes en las bacterias de las explotaciones ganaderas, pueden por lo tanto contribuir a aumentar los niveles de resistencias en infecciones humanas. Por ello el grupo de expertos en el uso no humano de antimicrobianos y de la resistencia antimicrobiana de la FAO/OIE/OMS ya recomendaron en 2003 elaborar una lista de antibióticos críticamente importantes para los humanos, es decir aquellos en los que el diagnóstico microbiológico y las pruebas de sensibilidad hayan determinado que no será eficaz ningún otro tipo de agente antimicrobiano. Así, la OMS organizó una consulta con un grupo de trabajo de expertos en Australia en 2005 y publicó listas de agentes antimicrobianos de importancia crítica, de importancia elevada y de importancia para la medicina humana (OMS, 2005) que posteriormente se ha ido actualizando. Igualmente recomendó a la OIE la elaboración de una lista de agentes antimicrobianos de importancia crítica para la medicina veterinaria, que se aprobó por primera vez en 2007 y se actualizó en 2013 y 2015.

La EMA en 2014 también estableció tres categorías de antibióticos en medicina veterinaria con las siguientes características:

- Categoría 1: Incluye antibióticos usados en medicina veterinaria con recomendaciones de uso por ser de riesgo en medicina humana o por ser de riesgo para la salud pública. No deben usarse como tratamiento profiláctico o de mejora de la producción aplicado en los alimentos o el agua, en ausencia de signos clínicos en el/los animal/es tratado/s. Debe confirmarse la presencia de la enfermedad en el rebaño antes del tratamiento metafiláctico. No deben ser utilizados bajo indicación general o de amplio espectro. Se limita la duración del tratamiento al tiempo mínimo necesario para el tratamiento de la enfermedad. En esta categoría se incluyen: macrólidos, polimixinas, rifamicinas, pleuromutilinas, penicilinas de amplio espectro y resistentes a betalactamasas y tetraciclinas.
- Categoría 2: Incluye antibióticos usados en medicina veterinaria de 2º elección y/o último recurso en su uso. Estos antibióticos están considerados de riesgo alto para la salud pública. En veterinaria es necesario el cumplimiento de los principios de uso responsable debido al riesgo existente de co-resistencia. No deben usarse como tratamiento profiláctico o de mejora de la producción en los alimentos o el agua, en ausencia de signos clínicos. No deben usarse como tratamiento de primera elección a menos que esté justificado, cuando se empleen como tratamiento de segunda elección o último recurso deberá hacerse sobre la base de los resultados de pruebas bacteriológicas. Su uso fuera de lo indicado en su autorización de comercialización o diferente del resumen de las características del producto deberá limitarse y reservarse a los casos en los que no

existan otras opciones de substitución. Dicha utilización deberá ser conforme a la legislación nacional en vigor. Se limita la duración del tratamiento al tiempo mínimo necesario para el tratamiento de la enfermedad. En esta categoría se incluyen: cefalosporinas de 3º y 4º generación, fluoroquinolonas y otras quinolonas, aminopenicilinas y aminoglucósidos.

- Categoría 3: Incluye antibióticos no aprobados para su uso en medicina veterinaria. El uso de estos antibióticos debe ser muy bajo y cumpliendo la Directiva 2001/82/CE, de acuerdo con sus restricciones, estos antimicrobianos sólo pueden ser utilizados en pequeños animales y en caballos cuyo destino no es la producción de alimentos. En esta categoría se incluyen carbapenemes y otros penemes, ésteres cíclicos (fosfomicina), cefalosporinas de última generación (ceftaroline y cetobiprole), glicopéptidos, glicilciclinas, lipopéptidos, monobactámicos, oxazolidinonas, riminofenazinas, sulfonas y otros medicamentos empleados para el tratamiento de la tuberculosis y otras micobacteriosis.

La superposición de las listas críticas establecidas para la medicina humana y veterinaria puede proporcionar más información y permitir que se alcance un equilibrio adecuado entre las necesidades zoonosanitarias y las consideraciones en materia de salud pública.

La OIE en el año 2015, proporciona una lista completa de todos los agentes antimicrobianos usados en animales destinados a la producción de alimentos dividiéndolos según dos criterios:

- Criterio 1: tasa de respuesta al cuestionario sobre los agentes antimicrobianos importantes para la medicina veterinaria. Se

consideró que este criterio se cumplía cuando una mayoría de los que respondieron (más del 50%) señalaron la importancia de una determinada clase de agentes antimicrobianos en su respuesta al cuestionario.

- Criterio 2: tratamiento de una enfermedad grave de los animales y disponibilidad de agentes antimicrobianos alternativos. Se consideró que este criterio se cumplía cuando se identificaron los compuestos de una clase como esenciales contra determinadas infecciones y se carecía de alternativas terapéuticas suficientes.

Basándose en estos criterios, se establecieron las siguientes categorías:

- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica: son aquellos que cumplen a la vez los criterios 1 y 2
- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia elevada: son aquellos que cumplen el criterio 1 o el 2
- Agentes antimicrobianos veterinarios de importancia: son aquellos que NO cumplen ni el criterio 1 ni el 2.

Dentro de la categoría de agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica de la lista de la OIE, algunas clases son de importancia crítica tanto para la salud humana como para la sanidad animal, como es actualmente el caso de las fluoroquinolonas y de la tercera y cuarta generación de cefalosporinas. Por lo tanto, esas dos clases de agentes antimicrobianos deberán emplearse de acuerdo con las siguientes recomendaciones:

- No usarse como tratamiento preventivo aplicado en los alimentos o el agua en ausencia de signos clínicos en el/los animal/es tratado/s.



- No usarse como primer tratamiento a menos que esté justificado; cuando se emplee como segundo tratamiento, en teoría deberá hacerse sobre la base de los resultados de pruebas bacteriológicas.
- Su uso fuera de lo indicado en su autorización de comercialización (AC) o diferente del resumen de las características del producto (RCP) deberá limitarse y reservarse a los casos en los que no existan otras opciones de sustitución. Dicha utilización deberá ser conforme a la legislación nacional en vigor.

La lista de la OIE de agentes antimicrobianos de importancia veterinaria se basa en dictámenes científicos de expertos y se actualizará con regularidad a medida que se disponga de nueva información (OIE, 2015).

La legislación en alimentación animal de la Comunidad Europea y la española en particular, han reaccionado en los últimos años con normativas restrictivas en cuanto al uso de antimicrobianos. Debido a la diversidad existente en cuanto a la legislación de piensos medicados, la Unión Europea ha elaborado una propuesta de Reglamento relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos y por el que se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo.

Esta propuesta legislativa incluirá una nueva regulación legal para los piensos medicados que simplificará la actual. Uno de los objetivos principales de esta nueva regulación es hacer accesible a los veterinarios un mayor número de medicamentos para tratar y prevenir las enfermedades de “especies menores” como cabras, pavos, caballos, abejas, etc. que actualmente no cuentan con un número demasiado amplio de productos autorizados para combatir sus enfermedades. Además la nueva legislación asegurará que los piensos medicados sólo se puedan fabricar con productos veterinarios autorizados específicamente y por fabricantes autorizados. Por otra parte, para reducir las resistencias microbianas en animales y personas y preservar el mayor número posible de antibióticos eficaces frente a las infecciones de

todas las especies, incluida la humana, la propuesta de la Comisión introduce la posibilidad de restringir la autorización y uso en animales de ciertos antimicrobianos, que quedarían reservados para su utilización en medicina humana.

La Comunicación de la Comisión 2015/C 299/04 aborda una serie de directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en medicina veterinaria. Estas directrices en relación con las aves de corral se concretan en lo siguiente:

“Es necesario adoptar medidas para evitar la medicación profiláctica en grupo, a menudo recurrente, de las aves de corral, que frecuentemente se lleva a cabo justo antes o después del transporte de pollitos de un día de vida o, en algunos casos, para hacer frente a la pérdida de productividad.

La inyección de antimicrobianos en los huevos y los pollitos de un día de vida en las incubadoras debe evitarse totalmente, salvo casos justificados por razones excepcionales, descritas con claridad en las directrices nacionales o regionales.

Las incubadoras deben mantener registros de la utilización de antimicrobianos en los huevos y deben proporcionar sus registros a petición de las autoridades competentes. No deben utilizarse de forma sistemática antimicrobianos a la llegada de los pollitos de un día de vida a la granja. La utilización profiláctica de antimicrobianos en esta etapa puede evitarse mediante una buena higiene de las incubadoras y una buena gestión de la producción de pollitos de un día de vida (por ejemplo, mediante control de la temperatura, higiene y estimulación de la bebida y la comida).

La gestión de la vacunación debe incluir medidas para evitar una reacción de estrés y mejoras en la disponibilidad de vacunas autógenas.

Debe evitarse la utilización de antimicrobianos para enfermedades no infecciosas con infecciones secundarias limitadas. Deben evaluarse las políticas de ganadería, cría y gestión para evitar la reproducción de tales enfermedades.

Debe prohibirse la utilización de cefalosporinas de tercera y cuarta generación en aves de corral (incluidos los huevos), de conformidad con la Decisión de la Comisión a raíz del procedimiento de arbitraje de 13 de enero de 2012 (Decisión de ejecución

C/2012/182) y en consonancia con el dictamen científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria sobre los riesgos para la salud pública de las cepas bacterianas productoras de betalactamasas de espectro ampliado (BLEE) y/o betalactamasas tipo AmpC en los alimentos y los animales destinados a la producción de alimentos debido al riesgo de que la resistencia a los antimicrobianos se transmita a los seres humanos.

De acuerdo con la decisión de la Comisión tras el procedimiento de arbitraje de 1 de julio de 2010 sobre las quinolonas para animales destinados a la producción de alimentos y la decisión de la Comisión tras el procedimiento de arbitraje de 28 de febrero de 2014, las fluoroquinolonas deben reservarse para el tratamiento de cuadros clínicos que presentan escasa respuesta, o que se espera que presenten escasa respuesta, a otras clases de antimicrobianos y, siempre que sea posible, deben utilizarse únicamente cuando se hayan llevado a cabo antibiogramas.

Deben introducirse programas específicos de bienestar de los animales, posiblemente incluyendo puntuaciones para pododermatitis.

Los antimicrobianos no se utilizarán como método específico de control de la salmonela en las aves de corral, como se establece en el artículo 2 del Reglamento (CE) nº 1177/2006. A fin de garantizar el cumplimiento de los objetivos de la UE para reducir la salmonela, los programas nacionales de control de todos los Estados miembros deben incluir medidas de bioprotección para prevenir la infección por salmonela en las granjas avícolas. La introducción de tales medidas también tiene un efecto positivo en términos de prevención de otras enfermedades.

Los Estados miembros deben hacer un seguimiento de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias zoonóticas e indicadoras tomadas de las poblaciones de animales destinados a la producción de alimentos y su carne, y comunicar los datos de conformidad con la Decisión de Ejecución 2013/652/UE de la Comisión, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos.”

En esta decisión ejecutiva se diferencian bacterias productoras de zoonosis (*Salmonella* spp y *Campylobacter* termófilos), bacterias comensales indicadoras (*E. coli* y *Enterococcus*) y bacterias comensales con fenotipo de interés desde un punto de vista de Salud Pública como *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación y a carbapenemes. Este último caso se aplicará a pollos, pavos, cerdos y bovinos de engorde. Las muestras de avicultura se recogerán los años pares, desde 2014 a 2020. Todos los datos son enviados anualmente a la EFSA, que realiza un informe donde se comparan los datos de resistencia a antimicrobianos entre países y las tendencias temporales (EFSA 2015).

Por último el Reglamento (UE) 429/2016 del Parlamento Europeo y del Consejo de reciente aprobación, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales recoge en su consideración 32 que “La resistencia a los antimicrobianos, entendida como la capacidad de los microorganismos para sobrevivir o multiplicarse en presencia de una concentración de un agente antimicrobiano que normalmente es suficiente para inhibir o matar microorganismos de la misma especie, está aumentando. En la acción nº 5 que se propone en la Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo titulada «Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas» se hace hincapié en la función preventiva del presente Reglamento y en la consiguiente reducción que se espera se haga del uso de antibióticos en animales. Estas resistencias de los microorganismos a antibióticos a los que antes reaccionaban complica el tratamiento de las enfermedades infecciosas tanto en seres humanos como en animales y por lo tanto puede representar una amenaza para la salud humana o animal. Como consecuencia de ello, los microorganismos que han desarrollado la resistencia a los antibióticos han de ser tratados como si fueran enfermedades transmisibles y, por tanto, deben entrar en el ámbito de aplicación del presente Reglamento. Esto permitirá tomar medidas contra los organismos resistentes a los antibióticos cuando proceda y sea necesario”. En su anexo II recoge la

*Escherichia coli* verotoxigénica en el listado de enfermedades transmisibles de los animales.

#### 1.8.1 *Alternativas al uso de antimicrobianos en la producción avícola*

La eliminación del uso de antibióticos en la producción animal puede tener consecuencias adversas sobre la producción, sanidad y bienestar de los animales. Por este motivo, en los últimos años se han desarrollado multitud de estudios destinados a investigar otras alternativas al uso de antibióticos en la producción animal. La OIE celebró en París en 2012 un simposium titulado “Alternatives to antibiotics: Challenges and solutions in animal production” en el que se trataron las alternativas existentes al uso de antibióticos en sanidad, producción animal y seguridad alimentaria. Ejemplos de alternativas al uso de antibióticos en alimentación animal serían: ácidos orgánicos, preparaciones enzimáticas, probióticos, prebióticos, potenciadores de la inmunidad, minerales de alta disponibilidad y aceites esenciales (Seal *et al.*, 2013).

En este sentido, los estudios sobre la influencia de la microbiota en la salud y en la producción animal se han incrementado notablemente en los últimos años. Los principales parámetros productivos, ganancia media diaria, índice de conversión y mortalidad, tienen una relación directa con la calidad y el equilibrio de la microbiota digestiva. El aumento notable de problemas digestivos poco específicos que viene detectándose en las explotaciones tiene también una relación directa con la microbiota. Problemas comunes como el síndrome de la cabeza hinchada, la colibacilosis o las clostridiosis en las explotaciones aviares son muchas veces las manifestaciones finales de alteraciones del ecosistema intestinal que originan problemas en la digestión y absorción de nutrientes o que permiten la multiplicación de agentes patógenos oportunistas como *E. coli* o *Clostridium perfringens*.

Por otra parte, la población bacteriana inicial del pollito recién nacido va a determinar su salud posterior así como su capacidad digestiva y, en consecuencia, su rendimiento productivo especialmente en animales de vida corta como los broilers. La microbiota modula la expresión de muchos genes del pollito, principalmente relacionados con su sistema inmunitario y con su fisiología digestiva. Esta microbiota puede verse alterada por diversos factores y tarda tiempo en volver al estado de equilibrio original. En un broiler este tiempo de recuperación puede suponer una diferencia notable en el rendimiento final.

La microbiota digestiva tiene la ventaja de que puede ser manipulada con relativa facilidad. Todo lo que el ave ingiere (pienso, agua, antibióticos, prebióticos, probióticos, etc.) influye de inmediato en ella. Estas posibilidades de actuación así como las posibilidades de seguimiento de la evolución de las poblaciones microbianas están abriendo un campo de trabajo nuevo que contribuirá notablemente a la mejora de la salud y de la productividad de la producción avícola.

El uso de antibióticos en la avicultura tal como lo hemos conocido hasta ahora tiene los días contados por lo que es imprescindible encontrar alternativas. En el caso de las enfermedades digestivas estas alternativas son más sencillas debido a las posibilidades de actuación sobre la microbiota. Entre las más viables están el empleo de probióticos, prebióticos y antimicrobianos no antibióticos. No existe el probiótico universal válido para cualquier situación, pero es posible utilizar probióticos específicos para controlar problemas concretos.

Los prebióticos son sustancias no metabolizables directamente por el ave, pero que favorecen la salud intestinal debido a que estimulan el crecimiento de la flora digestiva beneficiosa como lactobacilos y bifidobacterias.

Por último, también hay moléculas o productos principalmente de origen vegetal que tienen una capacidad antimicrobiana notable y que pueden sustituir en cierta medida

a los antibióticos (Rubio, 2013). Así, el empleo de aceites esenciales en piensos ha demostrado su eficacia estimulando el crecimiento de la microbiota beneficiosa y limitando el número de bacterias patógenas, aumentando el consumo de pienso y la digestibilidad de los nutrientes, efecto antioxidante y antiinflamatorio, mayor retención de nitrógeno, propiedades antivíricas, antifúngicas y efecto coccidiostático (Wenk, 2000; Huerta, 2008).

Cerisuelo *et al.*, 2014 mostraron un claro efecto de bajas dosis de aceites esenciales y butirato sódico en el control de *Salmonella* en broilers. La eficacia de las aplicaciones de aceites esenciales en el pienso depende de muchos factores como la cepa bacteriana o el origen del aceite, así como su combinación con otros aditivos. En general tienen un efecto positivo, pero el conocimiento de su uso en la alimentación de aves de corral es aún insuficiente y exige más investigaciones para aclarar su modo de acción, así como su dosis de administración, interacción con otros antimicrobianos para obtener los efectos deseados, etc. (Krishan & Narang, 2014).

El uso de algunos de estos compuestos como aditivos en los piensos ha hecho que la legislación europea en esta materia haya introducido cambios en los últimos años. Así el Reglamento (CE) 1831/2003 sobre los aditivos en la alimentación animal define como aditivo aquellas sustancias, microorganismos y preparados distintos de las materias primas para piensos y de las premezclas, que se añaden intencionadamente a los piensos o al agua a fin de realizar, en particular, una o varias de las siguientes funciones:

- influir positivamente en las características del pienso
- influir positivamente en las características de los productos animales
- influir favorablemente en el color de los pájaros y peces ornamentales
- satisfacer las necesidades alimenticias de los animales

- influir positivamente en las repercusiones medioambientales de la producción animal
- influir positivamente en la producción, la actividad o el bienestar de los animales, especialmente actuando en la flora gastrointestinal o la digestibilidad de los piensos, o tener un efecto coccidiostático o histomonostático.

Igualmente deben demostrar que no deben de:

- tener un efecto adverso para la sanidad animal, la salud humana o el medio ambiente;
- ser presentado de manera que induzca a error al consumidor;
- perjudicar al consumidor influyendo negativamente en las características distintivas de los productos animales o inducirle a error con respecto a las características distintivas de dichos productos.

Los piensos pueden presentarse en forma de materias primas para piensos, piensos compuestos, aditivos para piensos, premezclas o piensos medicamentosos. El Reglamento (CE) 767/2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos introduce nuevas definiciones de piensos, materias primas para piensos, etc. En este sentido, el Reglamento (CE) 242/2010 crea el catálogo de materias primas para piensos y finalmente la Recomendación de la Comisión de 14 de enero de 2011, establece directrices para la distinción entre materias primas para piensos, aditivos para piensos, biocidas y medicamentos veterinarios.

Además, para el mantenimiento de la salud de los animales y el funcionamiento satisfactorio de los programas de sanidad animal es imprescindible la administración fiable de vacunas puras, inocuas, potentes y eficaces. La inmunización de los animales con vacunas de gran calidad es el principal medio de control de muchas enfermedades animales.

Como la patogénesis y la epidemiología de cada enfermedad varía, el papel y la eficacia de la vacunación como medio de control varía también de una enfermedad a



otra. Algunas vacunas pueden ser de gran eficacia, induciendo una inmunidad que no sólo previene los síntomas de la enfermedad sino que también puede prevenir la infección y reducir la multiplicación y diseminación del agente causal de la enfermedad. Sin embargo, otras vacunas, pueden prevenir la enfermedad clínica pero no la infección y/o el estado de desarrollo del portador. En otros casos, la inmunización puede resultar completamente ineficaz o solo reducir la severidad de la enfermedad. De esta forma, la decisión de recomendar la vacunación como parte de la estrategia de control de las enfermedades animales, requiere un conocimiento profundo de las características del agente infeccioso y de su epidemiología, así como de las características y posibilidades de las diferentes vacunas disponibles (OIE, 2008).

En el caso de la colibacilosis aviar provocada por cepas APEC, esta enfermedad es controlada indirectamente por la vacunación contra otros trastornos respiratorios, minimizando las condiciones de estrés, y directamente por la administración de agentes antimicrobianos que erradican la infección en los rebaños infectados. Además del impacto económico que supone esta enfermedad en la producción avícola, estas cepas son consideradas la mayor fuente para el desarrollo de resistencias antimicrobianas, siendo evidente en Europa, EE.UU y Australia, donde más del 92% de los aislados de *E. coli* en aves eran resistentes a tres o más antimicrobianos a pesar de las estrictas medidas sobre el uso de antibióticos en este sistema de producción (Gyles, 2008).

Por este motivo, es importante el desarrollo de vacunas efectivas contra esta enfermedad. Para desarrollar la vacuna APEC ideal, deberá cumplir varias premisas, la primera de ellas es que tiene que ser capaz de inducir protección frente a varios serogrupos APEC, además, deberá inducir una respuesta inmune tanto mucosal como celular, tendrá que ser distribuida en masa para inmunizar a todos los animales de una misma nave, utilizando aerosoles, que es la ruta natural utilizada por las cepas

APEC y por último será administrada en edades tempranas, así las aves serán capaces de desarrollar una respuesta inmune a los 21 días de edad, momento en el cual son más vulnerables a la infección por estas cepas (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999).

El éxito de una vacuna es juzgado por su seguridad y grado de protección. Las tentativas para el desarrollo de vacunas contra cepas APEC se han centrado en vacunas inactivadas, vacunas de subunidades y vacunas vivas atenuadas. Los estudios sobre vacunas inactivadas desarrolladas hasta el momento concluyeron que sólo tenían protección frente a cepas homólogas a la vacunal y que la eficacia de dichas vacunas dependía de diversos factores como tipo de adyuvante utilizado, el método utilizado para inactivar dicha bacteria, vía y frecuencia de administración y la edad de las aves al administrar la vacuna.

Por el contrario, otros estudios demuestran la efectividad de las vacunas vivas atenuadas o de las vacunas de subunidades frente a cepas heterólogas. Las vacunas de subunidades son menos competitivas y atractivas para su uso comercial cuando las comparamos con las vacunas vivas debido a que no se replican en el hospedador requiriendo repetidas administraciones con fuertes adyuvantes (Ghunaim *et al.*, 2014).

Tanto las vacunas vivas como las inactivadas son menos laboriosas y más baratas que las vacunas de subunidades. Sin embargo, estas limitaciones pueden ser superadas por la administración de antígenos seleccionados en forma de vectores o quimeras. Así, Lee *et al.*, 2014 insertaron factores de virulencia APEC (*papA*, *papG*, *iutA*, *clpG*) en un vector (pBP244). Estos plásmidos fueron utilizados para transformar una cepa atenuada de *Salmonella Typhimurium*. El uso de esta cepa indujo una respuesta inmune importante en el hospedador tanto en la mucosa como a nivel celular. En el grupo de animales donde habían suministrado la vacuna

encontraron niveles significativamente más altos de interferón, interleuquina 2 e interleuquina 6, que estimularán la producción de anticuerpos, inducirán inflamación y activarán la capacidad lítica de los macrófagos. Además, el número de muertes y lesiones fue significativamente menor en el grupo de animales vacunados.

Aunque la respuesta inmunológica ante cepas APEC no es del todo conocida. Sadeyen *et al.* en 2015, al realizar un estudio con vacunas vivas e inactivadas, concluyeron que potenciando la respuesta Th2 y conservando las células B se obtendrían vacunas más efectivas para el control de esta enfermedad. La disponibilidad de secuencias genómicas y el reciente descubrimiento de nuevos factores de virulencia permitirá a los investigadores desarrollar nuevas vacunas que mejoren la seguridad de la industria aviar ante estas cepas (Ghunaim *et al.*, 2014).

Como complemento a todas estas alternativas se encuentran las medidas de bioseguridad, que se pueden definir como el conjunto de medidas que abarcan aquellas estructuras de la explotación y los aspectos del manejo orientados a proteger a los animales de la entrada y difusión de enfermedades infecto-contagiosas y parasitarias en las explotaciones.

Todo plan de bioseguridad debe ser flexible en su naturaleza, fácil y práctico de aplicar y versátil, de tal manera que pueda adaptarse a los avances en producción animal.

En líneas generales cualquier programa de bioseguridad ha de contemplar los siguientes aspectos:

1. Correcta localización de la granja.
2. Características constructivas de la nave.
3. Control de animales extraños a la explotación (animales salvajes, insectos, ratas, ratones, etc).
4. Limpieza, desinfección, desinsectación y desratización de la nave y del utillaje ganadero.

5. Utilización de lotes de la misma edad.
6. Control de las visitas y personal ajeno a la explotación.
7. Evitar el estrés de los animales.
8. Evitar la contaminación del pienso.
9. Controlar los programas de vacunación y medicación de los animales.
10. Control de las deyecciones, cadáveres, materias contumaces y animales enfermos o sospechosos de padecer enfermedades contagiosas.

La instauración de un programa de bioseguridad en una explotación avícola proporcionará un aumento de la productividad de los animales y un aumento en los rendimientos económicos. Así mismo, se verá reducido el uso de determinados antimicrobianos, con lo que estaremos reduciendo los residuos de antibióticos en los huevos y en las canales de los pollos.

En este sentido, la normativa higiénico-sanitaria y de bienestar animal desarrollada en los últimos años, ha ido encaminada a mejorar los aspectos de bioseguridad y densidad en las explotaciones avícolas. Así el RD 1084/2005 de ordenación de la avicultura de carne, recoge normativa en cuanto a la densidad permitida por animales, condiciones de bioseguridad y de bienestar animal. Por ejemplo en su anexo I recoge que las explotaciones de reproducción en sistema de cría y recría convencional de animales de la especie *Gallus gallus* en las que se mantengan aves de cría, cuando estén en fase de puesta, a partir de las 24 semanas de edad, las densidades máximas por metro cuadrado no podrán superar las siguientes cifras:

- Para explotaciones con sistemas de ventilación natural: 4,7 aves.
- Para explotaciones con sistemas de ventilación natural con refrigeración o calefacción: 5,3 aves.
- Para explotaciones con sistemas de ventilación forzada: 5,7 aves.
- Para explotaciones con sistemas de ventilación forzada con refrigeración o calefacción: 6,3 aves.

Así mismo, el Real Decreto 692/2010, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne establece que la densidad máxima de población en una explotación o en un gallinero de una explotación no excederá en ningún momento de 33 kilogramos de peso vivo por metro cuadrado de zona utilizable. En caso de cumplir ciertos requisitos de bienestar animal, el censo podrá incrementarse hasta los 39 kilogramos de peso vivo por metro cuadrado de zona utilizable que podrá ser incrementado en 3 kilogramos más de peso vivo por metro cuadrado, si:

- Los resultados de los controles de la explotación realizados por la autoridad competente en el plazo de los dos últimos años no han puesto de manifiesto deficiencias con respecto a los requisitos establecidos por este real decreto.
- El control realizado por el titular o criador de la explotación se lleva a cabo con arreglo a las guías de buenas prácticas de gestión.
- Y, en por lo menos siete manadas consecutivas de un gallinero supervisadas posteriormente, la tasa de mortalidad diaria acumulada es inferior al  $[1 \% + (0,06 \% \text{ multiplicado por la edad de sacrificio de la manada, expresada en días})]$

Igualmente el RD 773/2011, de 3 de junio, que modifica el RD 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de gallinas ponedoras, prohíbe el uso de jaulas no acondicionadas a partir del 1 de enero de 2012. Y en la cría en jaulas acondicionadas, las gallinas ponedoras deberán disponer de al menos  $750 \text{ cm}^2$  de superficie de la jaula por gallina, de un nido, de una yacija que permite picotear y escarbar y de aseladeros convenientes que ofrezcan como mínimo un espacio de 15 cm por gallina. Deberá preverse un comedero que pueda ser utilizado sin restricciones y un bebedero apropiado. Para facilitar la inspección de la instalación y la retirada de animales, las hileras de jaulas deberán estar separadas

por pasillos de 90 cm de ancho como mínimo, y deberá haber un espacio de 35 cm como mínimo entre el suelo del establecimiento y las jaulas de las hileras inferiores. Por último las jaulas estarán equipadas con dispositivos adecuados de recorte de uñas.

En los sistemas alternativos de cría de gallinas ponedoras como gallinas en suelo, tanto en planta única como en aviario con varias plantas y gallinas camperas con acceso a parques exteriores, la densidad de aves no deberá ser superior a nueve gallinas ponedoras por metro cuadrado de superficie. Las instalaciones deberán equiparse de tal modo que todas las gallinas ponedoras dispongan de comederos longitudinales que ofrezcan como mínimo 10 cm de longitud por ave, o bien de comederos circulares que ofrezcan como mínimo 4 cm de longitud por ave y de bebederos continuos que ofrezcan 2,5 cm de longitud por gallina, o bien, de bebederos circulares que ofrezcan 1 cm de longitud por gallina. También deberán tener al menos, un nido para siete gallinas, aseladeros convenientes sin bordes acerados y con un espacio de, al menos, 15 cm por gallina, la yacija deberá ocupar al menos un tercio de la superficie del suelo, etc.

Por último el Reglamento 834/2007 del Consejo, de 28 de junio, sobre productos ecológicos establece en zonas cubiertas que el número máximo de gallinas ponedoras por m<sup>2</sup> sea de seis y de cuatro al aire libre. En pollos de engorde el número de animales por m<sup>2</sup> debe ser de 10 en zona cubierta y de 4 en zona al aire libre.



## 2 OBJETIVOS

El problema de la resistencia a los antibióticos, es una de las principales amenazas para la salud pública, causando un gran impacto clínico, epidemiológico y microbiológico a nivel mundial. Por este motivo, es de gran interés conocer el potencial patógeno zoonótico de las cepas de *E. coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal de alto riesgo O25b:H4-B2-ST131 en la producción avícola intensiva.

En el presente estudio se han planteado los siguientes objetivos:

1. Conocer la prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE del tipo CTX-M y SHV, y de cepas de *E. coli* pertenecientes al grupo clonal O25b:H4-B2-ST131, así como otros posibles grupos clonales emergentes, en muestras de heces y ambientales de granjas avícolas.
2. Conocer el potencial patógeno de las cepas aviares aisladas mediante la determinación de sus perfiles de virulencia y las resistencias a antibióticos.
3. Conocer el potencial zoonótico de las cepas aviares mediante la determinación del grado de clonalidad de las mismas con respecto de aislados clínicos humanos causantes de infecciones extraintestinales.
4. Conocer el grado de diseminación actual de las cepas aviares desde la granja al consumidor a través de comparación con cepas aisladas de alimentos de origen aviar.





### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Características de las granjas muestreadas

Para la realización del presente estudio se analizaron muestras de origen fecal de animales sanos de 198 explotaciones avícolas de la comunidad autónoma gallega durante los años 2010, 2011 y 2012. De esas 198 explotaciones 48 eran granjas de gallinas ponedoras, 16 eran de pavos de engorde, 87 de pollos de engorde (broilers) y 48 correspondían a gallinas reproductoras (Figura 22).

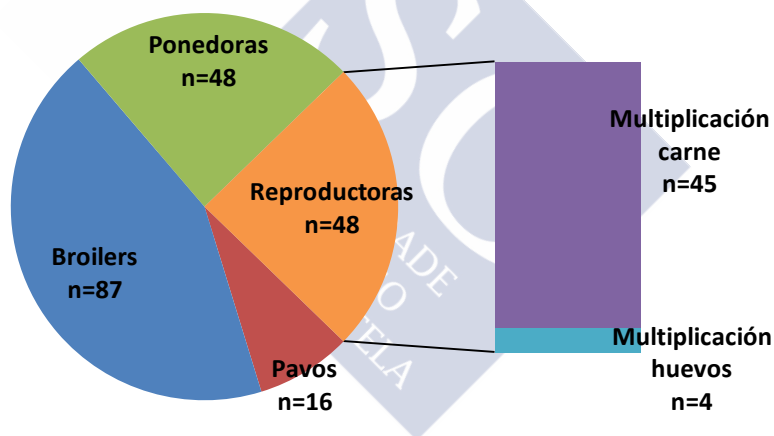
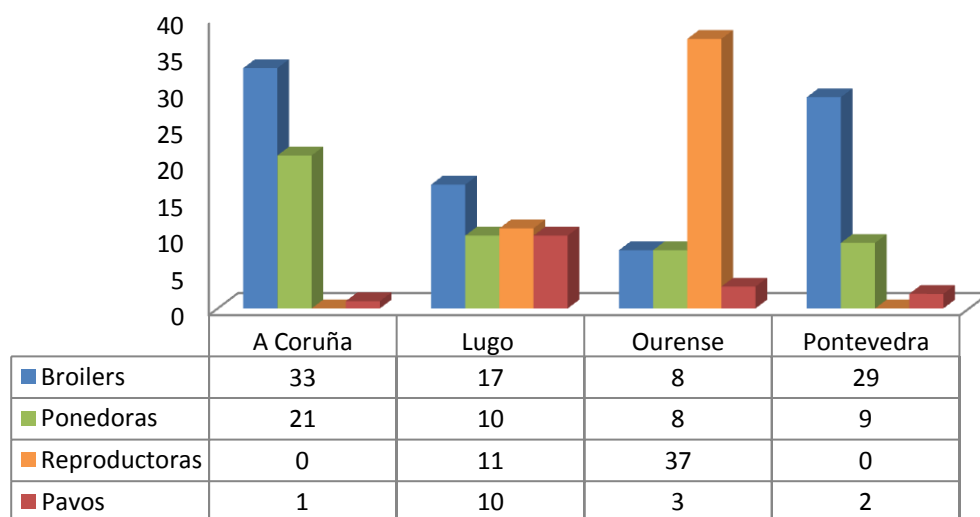


Figura 22. Distribución de las granjas estudiadas según su tipo de producción.

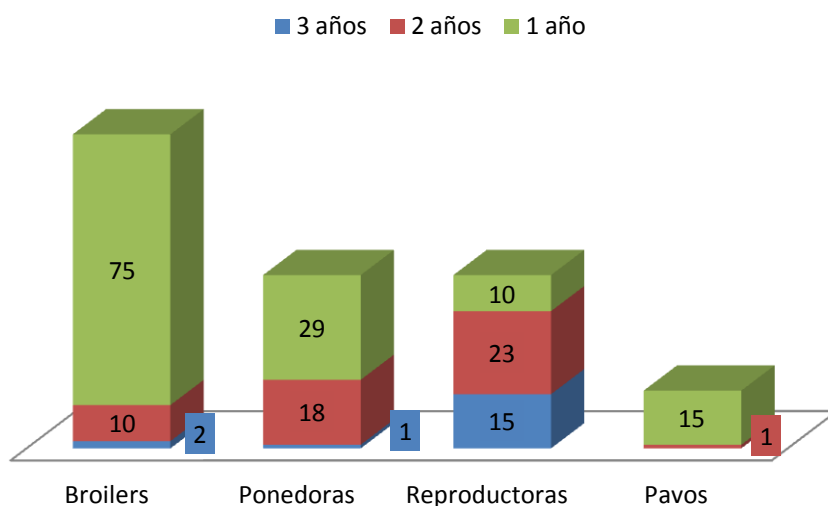
Debemos señalar que hubo una explotación que en el 2010 era de gallinas ponedoras y posteriormente cuando se volvió a muestrear en el 2012 había cambiado de aptitud pasando a ser de pollos de engorde. Igualmente en 2010 una granja de reproductoras de multiplicación de huevos se transformó en 2011 en multiplicación de carne.

Las explotaciones muestreadas en este estudio supondrían un 19.3% del censo de la especie *Gallus gallus* en Galicia y un 18.6% de las explotaciones de pavos de engorde de la comunidad gallega (Àlvarez 2011). Se recogieron muestras en las cuatro provincias gallegas (Figura 23).



**Figura 23. Distribución de las explotaciones según el tipo de producción de la granja y provincia.**

El 64% de las explotaciones fueron muestreadas únicamente un año, el 27% fueron muestreadas dos años y el 9% restante fueron muestreadas durante los tres años que duró el estudio (Figura 24).



**Figura 24.** Distribución de las granjas según su tipo de producción, muestreadas uno, dos o tres años.

El censo de las granjas muestreadas así como la edad de los animales variaba en función del tipo de producción de la explotación, como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Censo y edad de los animales en las granjas muestreadas.

	Edad (en semanas)				Censo			
	Máxima	Mínima	Mediana	Media	Máximo	Mínimo	Mediana	Media
Broilers	13	2	6	6,1	42613	200	13000	14404
Ponedoras	110	14	60	62	125500	50	7400	15972
Reproductoras	90	20	40	40.9	30025	2544	7838	8751
Pavos	22	11	14,5	14.5	10975	3000	5307	6179

Dentro de cada explotación podemos encontrarnos con una o varias manadas, entendiéndose por manada, según el RD 692/2010, como un grupo de pollos de engorde que se hallan alojados en un gallinero de una explotación, presentes en él a un mismo tiempo y que compartan la misma cubicación de aire. Asimilamos esta definición al resto de los sistemas de producción de este estudio.

El número de manadas muestreadas durante los tres años fueron 389, de las cuales, 103 eran de broilers, 65 de gallinas ponedoras, 201 de gallinas reproductoras y 20 de pavos de engorde.

En las granjas de broilers y pavos de engorde se realizó un único muestreo por manada. En las explotaciones de gallinas ponedoras cinco manadas fueron muestreadas dos veces con un intervalo de tiempo que osciló entre los tres y nueve meses, a las 60 manadas restantes se les realizó un único muestreo.

En el caso de las manadas de gallinas reproductoras, 140 manadas fueron muestreadas una sola vez, 56 dos veces con un intervalo de tiempo entre 2 y 8 meses y las cinco manadas restantes fueron muestreadas tres veces, con muestreos realizados entre uno y cinco meses.

### **3.2 *Recogida de muestras***

Las muestras fecales que se tomaron en las explotaciones variaban en función del tipo de producción de la granja. Así, en granjas de gallinas ponedoras, en el caso de manadas en jaula, el muestreo consistía en una muestra por manada de aproximadamente 150-200 gramos de heces mezcladas de forma natural procedentes de la cinta de recogida de heces, rasquetas o fosos dependiendo del sistema de recogida utilizado por cada explotación. En aquellas granjas que tuviesen otras formas de cría (en suelo, ecológicas, camperas) se tomó una muestra por manada formada por dos pares de calzas de material absorbente humedecidas con un diluyente compuesto por 8% de cloruro sódico y 0.1% de peptona en agua destilada estéril. Las calzas se colocaron sobre las botas del técnico que recorrió la nave en un sector que cubría al menos 100 pasos por cada par de calzas, de forma que estuviesen representados todos los sectores, incluyendo las áreas con cama y rejillas.

En el caso de explotaciones de aves reproductoras el sistema de recogida de heces frescas fue similar al de granjas de ponedoras y en la recogida de heces por medio de calzas en lugar de cuatro calzas se utilizaron cinco calzas por muestra y por manada.

Tanto en broilers como en pavos de engorde sólo se recogió una muestra por manada formada por dos pares de calzas.

Todas las muestras se recogieron en recipientes estériles por técnicos autorizados, permaneciendo en refrigeración a 4°C hasta su llegada al laboratorio. El tiempo transcurrido entre la recogida de muestras y la siembra en el laboratorio no superó nunca las noventa y seis horas.

Acompañando al muestreo se recogieron datos de cada explotación donde figuraban entre otros los siguientes: tipo de producción de la explotación, número de manadas, censo de animales, edad, vacunaciones, tratamiento con antimicrobianos en los quince días anteriores al muestreo, etc.

La recogida de muestras de este estudio está basada en la utilizada en los programas nacionales de *Salmonella* de la especie *Gallus gallus* y pavos de engorde en los años 2010, 2011 y 2012.



Figura 25. Recogida de muestras de heces.



**Figura 26.** Esquema del muestreo realizado en las granjas de broilers, donde se especifica el número de granjas, manadas analizadas y muestras recogidas.



**Figura 27.** Esquema del muestreo realizado en las granjas de gallinas ponedoras, donde se especifica el número de explotaciones, manadas analizadas y muestras recogidas.



**Figura 28.** Esquema del muestreo realizado en las granjas de gallinas reproductoras, donde se observa el número de explotaciones, manadas analizadas y muestras recogidas.



**Figura 29.** Esquema del muestreo realizado en las granjas de pavos de engorde, donde se observa el número de explotaciones, manadas analizadas y muestras recogidas.



### 3.3 Cepas control y conservación de las cepas

En todos los ensayos fenotípicos y genotípicos se emplearon cepas control positivas y negativas de la colección del LREC-USC (Tabla 8). Las cepas se conservaron en agar nutritivo con 0.75% (p/v) de agar a temperatura ambiente. Para preparar este medio de conservación se mezclaron 11,5 g/l de agar nutritivo (Difco) y 4 g/l de caldo nutritivo (Difco). En este medio, las cepas mantienen su viabilidad sin necesidad de resiembra al menos durante cinco años.

Tabla 8. Cepas control de referencia.

CEPA CONTROL	GENES
<b>E. COLI EXTRAINTESTINALES</b>	
FV9157	$\alpha$ -hlyA
FV17137	rfbO25b, fliC <sub>h4</sub>
FV9873	afa/draBC
FV10041	chuA, yjaA, TSPE, ibeA, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, fimAv <sub>MT78</sub> , papEF, iroN, malX, papG III, sfa/focDE, cnf1, hlyA, neuC-K1, usp, uidA
FV10042	papG I, kpsM II-K5, chuA, yjaA, TSPE, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, papEF, iroN, malX, cnf1, hlyA, neuC-K1, usp, uidA
FV10043	papG II, sat, chuA, yjaA, TSPE, KpsM II, KpsM II-K2, fimH, papEF, iroN, malX, cdtB, kpsM II-K5, sat, usp, uidA
FV10044	YjaA, hlyE, iucD, iutA, traT, tsh, cvaC, iss
FV10045	papG II, sat, YjaA, iucD, iutA, traT, afa/draBC
FV17134	KpsM III
FV7392a	papG I
<b>BLEE</b>	
FV9650	bla <sub>CTX-M</sub> , bla <sub>CTX-M-15</sub> , bla <sub>CTX-M</sub> grupo 1, bla <sub>CTX-M</sub> grupo 9, bla <sub>TEM</sub>
FV9649	bla <sub>CTX-M</sub> , bla <sub>CTX-M-15</sub> , bla <sub>CTX-M</sub> grupo 1, bla <sub>CTX-M</sub> grupo 9, bla <sub>TEM</sub>
FV10798	bla <sub>SHV</sub>
FV10794	bla <sub>SHV</sub>
FV17090	fimH, rfbO25b, fliC <sub>h4</sub> , bla <sub>CTX-M</sub> , bla <sub>CTX-M-15</sub>
H2397	bla <sub>CTX-M-14b</sub>
H3066	bla <sub>CTX-M14a</sub>
<b>ANTÍGENO O</b>	
FV17090	rfbO25b

### 3.4 Aislamiento de *E. coli*

Las muestras de heces se sembraron directamente en medio agar MacConkey Lactosa (MACL) (BioMérieux) mediante el método de agotamiento en estría, mientras que las muestras de calzas se sometieron a un preenriquecimiento previo de  $18\pm 2$ h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agua de peptona tamponada (BioMérieux).

El medio MACL es selectivo y diferencial para el aislamiento de bacterias coliformes y gérmenes entéricos. En su composición se incluyen sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de microorganismos gram positivos. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  18-24h en condiciones de aerobiosis.

A partir del crecimiento en confluyente del primer cuadrante se realizó la detección de los genes *bla* que codifican para BLEE de los tipos SHV y CTX-M siguiendo el protocolo descrito por Leflon-Guibout *et al.*, 2004, 2008 y del gen que codifica para el serogrupo O25b por PCR empleando los primers descritos por Clermont *et al.*, 2008 (Tablas 11 y 12).

En los cultivos positivos se seleccionaron diez colonias a las que se le volvió a realizar las pruebas de PCR para detección de enzimas BLEE y del antígeno O25b.

Se seleccionó más de una cepa por muestra únicamente en aquellos casos en que se encontraron cepas con diferentes características.

### 3.5 *Métodos Genotípicos*

#### 3.5.1 *PCR para genes de enzimas BLEE, de virulencia y del antígeno O25b*

Los genes de enzimas BLEE y AmpC, de virulencia de ExPEC y del antígeno O25b se detectaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), utilizando primers (cebadores) específicos (Tablas 9 a 13).

#### **Preparación de las muestras: extracción del ADN**

- Sembrar la cepa problema en medio TSA (agar de triptona de soja) (Oxoid) e incubar (37°C/18 h).
- Recoger con un asa estéril el crecimiento equivalente a una o dos colonias y suspender en 300 µl de agua bidestilada estéril contenidos en un tubo eppendorf.
- Calentar la suspensión 100°C/3-5 minutos.
- Centrifugar la suspensión calentada (11.000 rpm/2 min).
- Del sobrenadante se toman 7 µl para la prueba.

#### **Preparación de la mezcla de reacción**

La mezcla de reacción se prepara para un volumen final por muestra de 30 µl. que contiene:

- El ADN extraído de la muestra problema (7 µl).
- Los primers específicos (0,2-0,5 µM).
- Buffer coloreado 5X MyTaq<sup>TM</sup> Red Reaction Buffer (Bioline) (6µl), que incluye: dNTps, Tris HCl 10 mM (pH 8.8), ClK 50 mM, Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM.
- Una unidad de polimerasa (MyTaq<sup>TM</sup> DNA polymerase, Bioline) (0.2 µl).

- Agua bidestilada estéril hasta completar los 30 µl del volumen final.

### **Amplificación**

La amplificación se llevó a cabo en termocicladores (modelo 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems). Las mezclas de reacción fueron sometidas a:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial (94°C/3 min).
- Seguido de 35 ciclos de 94°C/1 min (desnaturalización), T<sup>a</sup> de hibridación/40 s (acoplamiento-anneling) y 72°C/2 min (polimeración).
- 1 ciclo de polimeración final a 72°C/3 min.

### **Revelado de los resultados de la PCR**

Los productos amplificados en las pruebas de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Seakem® LE agarose, Lonza) al 2% en tampón TBE (89 mM Tris, 89mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA), cargando en cada pocillo 12 µl de muestra amplificada. En todas las analíticas se incluyeron cepas control positivas y negativas. En la puesta a punto de las pruebas también se incluyó un marcador de pesos moleculares, el ADN del bacteriófago øX174 cortado con *Hae*III (fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pares de bases) (Promega).

La electroforesis se realizó con fuentes y cubetas de electroforesis de Bio-Rad. El voltaje aplicado a los geles fue de 130 V durante 20-40 min, dependiendo del tamaño del gel. Los geles de agarosa se tiñeron en un baño con bromuro de etidio (10 µg/ml) (Merck) y se observaron bajo luz ultravioleta (transiluminador modelo 2010 Macrovue, LKB).

**Tabla 9. Primers utilizados en la PCR para la detección de genes de virulencia de ExPEC.**

NOMBRE DEL GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5' - 3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>fimH</i>	fimH F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	508	58-66	Johnson & Stell, 2000
	fimH R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA			
<i>fimA</i> <sub>MT78</sub>	fimA201	TCTGGCTGATACTACACC	266	52	Marc & Dho-Moulin, 1996
	fimA215	ACTTTAGGATGAGTACTG			
<i>papAH</i>	Forward	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	717	70	Johnson <i>et al.</i> , 2015b
	Reverse	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC			
<i>papC</i>	Forward	GTGGCAGTATGAGTAATGACCGTTA	205	60	Johnson <i>et al.</i> , 2015b
	Reverse	ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA			
<i>papEF</i>	PapEF F	GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT	336	58-66	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	PapEF R	AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA			
<i>papG</i> I	Pap-I F	TTAGCTGGATGGCACAATG	335	54	Mora <i>et al.</i> , 2013
	Pap-I R	TTGTCCATGTATCCCATTCAT			
<i>papG</i> II	Pap-II F	GGGCATTGCTACGGTAACCTG	545	54	Mora <i>et al.</i> , 2013
	Pap-II R	CGCTATTAATAGACAGATCACC			
<i>papG</i> III	Pap-III F	CGGCAACTTTAAGCTATGTG	720	56	Mora <i>et al.</i> , 2013
	Pap-III R	TGTACCATCTCATCGTTGTCTC			
<i>sfa/focDE</i>	sfa1	CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC	410	56-64	Le Bouguenec <i>et al.</i> , 1992
	sfa2	CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA			
<i>afa/draBC</i>	afa1	GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC	602	64	Daigle <i>et al.</i> , 1994
	afa2	CATCAAGCTGTTTGTCTCGCCCG			
<i>yfcV</i>	Forward	ACATGGAGACCACGTTACCC	292	63	Spurbeck <i>et al.</i> , 2011
<i>cnf1</i>	cnf1-F2	CAGGAGGTACTTAGCAGCGT	468	48-58	Mora <i>et al.</i> , 2013
	cnf1-RC	TAATTTTGGGTTTGTATC			
<i>cdtB</i>	cdt-s1	GAAAGTAAATGGAATATAAATGTCCG	467	48-52	Tóth <i>et al.</i> , 2003
	cdt-as1	AAATCACCAAGAATCATCCAGTTA			
	cdt-s2	GAAAATAAATGGAACACACATGTCCG			
	cdt-as2	AAATCTCCTGCAATCATCCAGTTA			
<i>sat</i>	SatF	GCAGCTACCGCAATAGGAGGT	937	60	Johnson <i>et al.</i> , 2003b
	SatR	CATTGAGAGTACCGGGGCCA			
<i>tsh</i>	tsh03	GGTGGTGCAGTGGAGTGG	640	54-56	Dozois <i>et al.</i> , 2000
	tsh15	AGTCCAGCGTGATAGTGG			
<i>hlyA</i>	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1177	64	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	hly r	ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA			
<i>hlyF</i>	Forward	TCGTTTAGGGTGCTTACCTCAAC	444	60	Morales <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	TTTGGCGGTTTAGGCATTCC			
<i>vat</i>	Forward	TCAGGACACGTTTACGGCATTAGT	1100	63	Vigil <i>et al.</i> , 2011
	Reverse	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGTT			
<i>iucD</i>	Aer f	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	602	60	Yamamoto <i>et al.</i> , 1995
	Aer r	AATATCTTCTCCAGTCCGGAGAAG			
<i>iutA</i>	Aer-851f	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	301	66	Johnson & Stell, 2000
	Aer-1152r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			

NOMBRE DEL GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5'-3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>iroN</i>	Ironec-f	AAGTCAAAGCAGGGGTGCCCCG	665	54	Johnson <i>et al.</i> , 2000
	Ironec-r	GACGCCGACATTAAGACGCAG			
<i>fyuA</i>	Forward	GTAAACAATCTTCCGCTCGGCAT	850	63	Vigil <i>et al.</i> , 2011
	Reverse	TGACGATTAACGAACCGGAAGGGA			
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	58	Clermont <i>et al.</i> , 2000, 2013
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
<i>Kii-kpsM II</i> <sup>a</sup>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	60	Johnson & Stell 2000
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>kpsM II-K2</i> <sup>a</sup>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	578	60	Johnson & O'bryan, 2004
	KpsII-K2r	AGGTAGTTCAGACTCACACCT			
<i>kpsM II-K5</i> <sup>a</sup>	K5-f	CAGTATCAGCAATCGTTCTGTGA	157	54	Johnson & Stell 2000
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>neuC-K1</i> <sup>a</sup>	neu1	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGTG	676	54	Moulin-Schouleur <i>et al.</i> , 2006
	neu2	GGTGGTACATCCCGGGATGTC			
<i>kpsM III</i>	KpsIII f	TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT	390	54	Johnson & Stell 2000
	KpsIII r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC			
<i>cvaC</i>	ColV-Cf	CACACACAACGGGAGCTGTT	680	68	Johnson & Stell 2000
	ColV-Cr	CTCCCCGACGATAGTTCCAT			
<i>iss</i>	is-f	CAGCAACCCGAACCACTTGATG	323	62	Johnson JR <i>et al.</i> , 2008b
	is-r	AGCATTGCCAGAGCGGCAGAA			
<i>traT</i>	TraT f	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	290	60	Johnson & Stell 2000
	TraT r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG			
<i>ibeA</i>	ibe10 f	AGGCAGGTGTGCGCCGCTAC	170	58	Johnson & Stell 2000
	ibe10 r	TGGTGCTCCGGCAAACCATGC			
<i>malX (PAI)</i>	MALX-F	GCATGAGCAGTGCGATACATCGC	828	68	Mora <i>et al.</i> , 2013
	MALX-R	AGGGCTGGGAAGTGGTTTAGCC			
<i>usp</i>	usp-f	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440	68	Bauer <i>et al.</i> , 2002
	usp-r	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC			
<i>ompT</i>	Forward	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	444	60	Morales <i>et al.</i> , 2004
	Reverse	CCCGGGTCATAGTGTTCATC			

<sup>a</sup> Ver tabla 10

**Tabla 10. Determinación del tipo de cápsula en base a los resultados de PCR para los genes *kpsM II*, *neuC-K1*, *kpsM II-K2* y *kpsM II-K5***

TIPO DE CÁPSULA	GENES			
	<i>kpsM II</i>	<i>neuC</i>	<i>kpsM II-K2</i>	<i>kpsM II-K5</i>
<i>kpsM II-K1</i>	+	+	+	-
<i>kpsM II-K2</i>	+	-	+	-
<i>kpsM II-K5</i>	+	-	+	+

**Tabla 11. Primers utilizados para la detección y tipificación enzimas BLEE.**

GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5´-3´)	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	542	55	Mora <i>et al.</i> , 2013
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 1</sub>	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	60	Saladin <i>et al.</i> , 2002
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 1</sub>	<sup>b</sup> CTX-15-F1	GAAGCTAATAAAAAACACACGTGG	1044-1123	52	Mora <i>et al.</i> , 2013
	<sup>b</sup> CTX-15-R	GTATGCGCAAGCGCAGGTGG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub>	<sup>a</sup> CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	64	Simarro <i>et al.</i> , 2000
	<sup>a</sup> CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub>	<sup>b</sup> CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	998	44	LREC, sin publicar
	<sup>b</sup> CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub>	<sup>b</sup> CTX-M9-14-14B-24-F	GAATACTGATGTAACACGGA	989	52	LREC, sin publicar
	<sup>b</sup> CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub>	<sup>b</sup> CTX-M9-14B-F	CCTATACCCGAGGCGCGACAG	1059	44	LREC, sin publicar
	<sup>b</sup> CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M grupo 9</sub>	<sup>b</sup> CTX-M14-24-F	CTAAATTCCTTCGTGAAATAGTG	1049	44	LREC, sin publicar
	<sup>b</sup> CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15 extremo 3´</sub>	CTX-M-F1	ATAAAACCGGCAGCGGTG	483	60	Leflon-Guibout <i>et al.</i> , 2004
	CTX-M-F2	GAATTTTGACGATCGGGG			
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F2	TTGTGCTTCTTTACTCGCC	879	64	Mora <i>et al.</i> , 2013
	SHV-R2	CCCGGCGATTGCTGATTTCGC			
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<sup>b</sup> SHV-1	GGGTTATTCTTATTGTGCGC	930	48	Rasheed <i>et al.</i> , 1997
	<sup>b</sup> SHV-2	TTAGCGTTGCCAGTGCTC			
<sup>a</sup> Primers utilizados para PCR y secuenciación					
<sup>b</sup> Primers utilizados para la secuenciación					

**Tabla 12. Primers utilizados para la amplificación del gen *rfbO25b*.**

GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5' - 3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>rfbO25b</i>	rfb.1bis.f	ATACCGACGACGCCGATCTG	300	56	Clermont <i>et al.</i> , 2008
	rfbO25b.r	TGCTATTCAATTATGCGCAGC			

**Tabla 13. Primers utilizados para detectar genes de  $\beta$ -lactamasas AmpC y secuenciación de CMY-2.**

DIANA	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5'-3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
LAT-1 – LAT-4 CMY-2 – CMY-7 BIL-1	CITMF	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	462	64	Pérez-Pérez & Hanson 2002
	CIRMR	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC			
CMY <sup>a</sup>	bCMY-2F	AACACACTGATTGCGTCTGAC	1194	66	
	bCMY-2R	CTGGGCCTCATCGTCAGTTA			

### 3.5.2 Determinación de los grupos filogenéticos

La determinación de los grupos filogenéticos se llevó a cabo siguiendo los métodos de Clermont *et al.*, 2000 (Tablas 14 y 15) y Clermont *et al.*, 2013 (Tablas 16 a 19).

**Tabla 14. Primers para la determinación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D (Clermont *et al.*, 2000).**

GEN/FRAGMENTO DE ADN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5' - 3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
chuA	ChuA.1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	62	Clermont <i>et al.</i> , 2000
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA	YjaA.1	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	211	54	
	YjaA.2	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC			
TSPE4.C2	TspE4.C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	54	
	TspE4.C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG			

**Tabla 15. Grupos filogenéticos en base a los genes *chuA* y *yjaA*, y el fragmento TSPE4.C2 (Clermont *et al.*, 2000).**

GRUPO FILOGENÉTICO	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	-	+/-	-
B1	-	+/-	+
B2	+	+	+/-
D	+	-	+/-

**Tabla 16. Primers para la determinación de los grupos filogenéticos A, B1, B2, C, D, E y F (Clermont *et al.*, 2013).**

GEN/FRAGMENTO DE ADN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5´- 3´)	TAMAÑO (pb)	Tº DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
chuA	ChuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	58	Clermont <i>et al.</i> ,2013
	ChuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			Clermont <i>et al.</i> ,2000
yjaA	YjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTGAGGAG	211		Clermont <i>et al.</i> , 2013
	YjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
TSPE4.C2	TspE4C2.1b	CACTATTGTAAGGTCATCC	152		
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
arpA	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			



**Tabla 17. Grupos filogenéticos en base a los genes *arpA*, *chuA* y *yjaA* y el fragmento TSPE4.C2 (Clermont *et al.*, 2013).**

Grupo filogenético	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A <sup>a</sup>	+	-	+	-
A	+	-	-	-
B1	+	-	-	+
B2	-	+	+	+/-
B2	-	+	-	+
C <sup>a</sup>	+	-	+	-
D <sup>b</sup>	+	+	-	+/-
E <sup>b</sup>	+	+	-	+/-
E	+	+	+	-
F	-	+	-	-

<sup>a</sup> Realizar PCR para distinguir entre A y C usando los primers de la Tabla 18.

<sup>b</sup> Realizar PCR para distinguir entre D y E usando los primers de la Tabla 19.

**Tabla 18. Primers utilizados para determinar el grupo filogenético C.**

DIANA	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5'- 3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>trpAgpC</i>	trpAgpC.1	AGTTTATGCCCAGTGCGAG	219	56	Lescat <i>et al.</i> , 2012
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC			
<i>trpA</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		Clermont <i>et al.</i> , 2008
	trpBA.r	GCAACGCGGCTGGCGGAAG			

NOTA: Si ambos genes son positivos el grupo filogenético será el C, pero si *trpAgpC* es negativo será el A.

**Tabla 19. Primers utilizados para determinar el grupo filogenético E.**

DIANA	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5'-3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
arpA	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	57	Lescat <i>et al.</i> , 2012
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG			
trpA	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		Clermont <i>et al.</i> , 2008
	trpBA.r	GCAACGCGCCTGGCGGAAG			

NOTA: Si ambos genes son positivos el grupo filogenético será el E, pero si *arpA* es negativo será el D.

### 3.5.3 Clonotipado

Weissman y colaboradores (2012) diseñaron una nueva herramienta de genotipado de gran utilidad en los análisis epidemiológicos moleculares. Se trata de un esquema denominado clonotipado (CH), que se basa en la secuenciación de dos loci (*fumC*/*fimH*). En concreto, se analiza un fragmento interno de 489 nucleótidos del gen *fimH* y un fragmento interno de 469 nucleótidos del gen *fumC* (Tabla 20).

**Tabla 20. Primers utilizados en el clonotipado.**

GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5'-3')	TAMAÑO (pb)	Tª DE HIBRIDACIÓN °C	REFERENCIA
<i>fimH</i>	fimH-wf	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	975	54	Weissman <i>et al.</i> , 2012
	fimH-wr	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC			
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	56	* <a href="http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli">http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli</a>
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			

MLST Dababase from the Achtman scheme <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>

### 3.5.4 Multilocus Sequence Typing (MLST)

La técnica de tipado de secuencias multilocus (MLST) se ha revelado como una herramienta de tipado filogenético fundamental, tanto para estudios de evolución como epidemiológicos globales. Esta técnica utiliza las secuencias de fragmentos internos amplificados por PCR de genes altamente conservados que definen el perfil alélico o secuencia tipo (ST) para cada cepa (Wirth *et al.*, 2006). Siguiendo el esquema de MLST de Achtman se utilizaron los primers especificados en la Tabla 21 para siete genes (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*).

**Tabla 21. Primers utilizados en MLST para determinar las secuencias tipo (STs) del esquema de Achtman.**

GEN	PRIMERS	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA (5' - 3')	TAMAÑO (pb)	Tº DE HIBRIDACIÓN °C
<i>adk</i> (adenylate kinase)	adkF	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	975	56
	adkR	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i> (fumarate hydratase)	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	806	56
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTTC		
<i>gyrB</i> (DNA gyrase)	gyrBF	TCGGCGACACGGATGACGGC	911	56
	gyrBR	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i> (isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase)	icdF	ATGAAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	878	56
	icdR	GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i> (malate dehydrogenase)	mdhF	ATGAAAAGTCGCAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG	932	66
	mdhR	TTAACGAACTCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purA</i> (adenylosuccinate dehydrogenase)	purAF	CGCGCTGATGAAAAGAGATGA	816	56
	purAR	CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i> (ATP/GTP binding motif)	recAR1	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	780	56
	recAF1	ACCTTTGTAGCTGTACCACG		

Las secuencias obtenidas se editaron y revisaron utilizando el programa BioEdit (Carlsbad, CA), version 7.0.1. Se igualaron los tamaños de fragmento mediante comparación con los templados alélicos de la cepa de *E. coli* MG1655 proporcionados por la página web (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>), obteniéndose a través de la base de datos de dicha página las secuencias tipo correspondientes a las combinaciones alélicas de los siete genes.

### 3.5.5 *Secuenciación de genes*

La secuenciación de fragmentos de ADN se empleó para el tipado de enzimas de cepas BLEE y AmpC, así como para el clonotipado y MLST. Se llevó a cabo en la Plataforma de Secuenciación e Xenómica Funcional del departamento de Xenética de la Facultad de Veterinaria del Campus de Lugo (USC), mediante el método Sanger. El equipo empleado con este fin fue un analizador genético ABI 3100 (Applied Biosystems) con los reactivos BigDye Terminador v3.1 cycle sequencing kit. Los primers utilizados para la secuenciación se listan en las Tablas 11, 13, 20 y 21.

### 3.5.6 *Pulstipos obtenidos por electroforesis en campo pulsado (PFGE)*

La técnica de PFGE es una herramienta de subtipado molecular con un poder de discriminación superior a los métodos de clonotipado y MLST. Es un método de referencia para muchas redes/organizaciones mundiales (PulseNet, FoodNet, EU-RL VTEC) especialmente, en estudios epidemiológicos locales en los que interesa detectar cepas implicadas en brotes y sus fuentes de origen.

Esta técnica se basa en el análisis de perfiles de macrorrestricción obtenidos con enzimas de restricción (en nuestro caso utilizamos la enzima *XbaI*), que cortan de manera infrecuente el ADN cromosómico para generar grandes fragmentos de ADN (mayores de 40 kb), que no se podrían separar mediante electroforesis convencional, por lo que, para conseguirlo se alterna cíclicamente la orientación del campo eléctrico durante el proceso electroforético (PFGE) (Figura 30).

Para el análisis de los perfiles de macrorrestricción obtenidos con la enzima *XbaI* se utilizó el programa BioNumerics version 5.0. (Applied Maths, Sint-Martens-Latem) empleando el índice estadístico Dice, basado en el método de UPGMA (unweighted

pair group method using arithmetic averages) para la construcción de dendrogramas que reflejan la distribución de las cepas en clusters con más de un 85% de homología (cepas clonalmente relacionadas, con seis o menos bandas de diferencia).

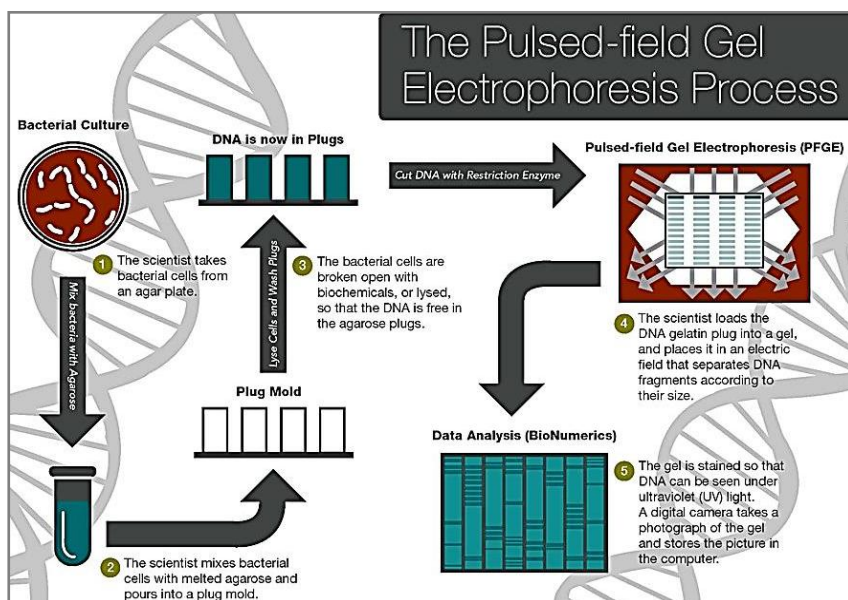


Figura 30. Esquema de la técnica de PFGE (<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocol-images.html#pfge>).

La técnica de PFGE se llevó a cabo en un equipo CHEF MAPPER (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo estandarizado de PulseNet con pequeñas modificaciones.

(<http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>). Brevemente:

### Lisis celular

- Suspensión en 2 ml de CSB (100 mM Tris: 100 mM EDTA; pH 8) de las cepas bacterianas crecidas en TSA 18-24 h a 37 °C, incluida la cepa control *Salmonella* Braenderup.

- Medir absorbancia a 420 nm.
- Preparar 400 µl de la suspensión a una concentración de 0,9 (ajustar con CSB).
- Añadir a cada suspensión 20 µl de proteinasa K (de una concentración de 20 mg/ml).
- Mezclar los 400 µl de la suspensión bacteriana anterior con 400 µl de agarosa al 1%, previamente atemperada a 55 °C (agarosa para bloques = 0,50 g de agarosa SeakemGold, 45 ml de buffer TE [10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH 8], 5 ml de SDS 10%) y preparar los bloques (2 bloques por muestra). Dejar solidificar unos 15 min a temperatura ambiente o 5 min a 4 °C.
- En tubos de 10 ml añadir 5 ml de buffer de lisis (50 mM Tris: 50 mM EDTA + 1% Sarkosyl; pH8) y 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Depositar los bloques en los tubos correspondientes.
- Incubar 3 h a 55 °C en agitación.
- Retirar el buffer de lisis. Lavar con 5 ml de agua bidestilada previamente atemperada a 50 °C, 20 min en agitación a 50 °C.
- Realizar otro lavado con agua en las mismas condiciones.
- Retirar el agua y realizar tres lavados con 5 ml de buffer TE (10 mM Tris: 1 mM EDTA; pH 8) previamente atemperado a 50 °C, cada lavado será de 20 min a 50 °C en agitación.
- Retirar el TE y añadir 5 ml de TE fresco. Conservar así los bloques a 4 °C hasta el día siguiente.

## **Digestión del ADN**

- Cortar una porción del bloque de agarosa del grosor de un porta e introducirlo en un tubo eppendorf. Se realiza en dos pasos:
  - Preincubación: termobloque a 37 °C, 15 min en 200 µl del buffer H 10X diluido en agua bidestilada. Pasado ese tiempo retiramos el buffer de preincubación y añadimos la enzima.
  - Incubación: termobloque a 37 °C, 180 min en 200 µl de la enzima XbaI (10 U/µl por muestra) diluida en buffer H.

## **Electroforesis**

- Una vez terminada la digestión, montar los cortes de bloque sobre los 15 dientes del peine para la electroforesis, incluyendo la cepa control Salmonella Braenderup en las posiciones 1, 8 y 15. Preparar el gel con 150 ml de agarosa SeakemGold al 1% en TBE 0,5X. Atemperar la agarosa a 55 °C antes de añadirla al molde en el que se ha colocado el peine.
- Preparar 2 l de tampón TBE, de manera que las concentraciones 1X sean de 0,089 M de Tris base; 0,089 M de ácido bórico (pH 8,3) y 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA (diluimos 200 ml de TBE 5x con 1.800 ml de agua destilada). Vertemos el tampón diluido en la cubeta de electroforesis y dejamos enfriar a 14 °C. Colocamos el gel y realizamos la electroforesis.
- Condiciones de electroforesis en el CHEF Mapper para *E. coli*:
  - Auto Algorithm
  - 30 kb-low MW-600 kb-high MW
  - Pulso inicial: 2,16 s; Pulso final: 54,17 s; Tiempo de electroforesis: 21.30 h

### **Revelado del gel**

Tinción del gel en agua destilada con 10 µl/ml de bromuro de etidio (de la solución stock 10 mg/ml) durante 20-30 min en agitación. A continuación, eliminamos el baño y lavamos el gel al menos 1 h en agua destilada en agitación. La captura de imagen de los geles para su posterior tratamiento con el programa BioNumerics se realizó con el sistema de fotodocumentación GelDoc (BioRad) y el programa Quantity One 4.6.3.

## **3.6 Métodos fenotípicos**

### **3.6.1 Biotipado y sensibilidad antimicrobiana**

Tras la detección por métodos genotípicos (PCR) de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE se realizó en la Unidad de Microbiología del Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia (LASAPAGA) la identificación fenotípica y el antibiograma de las mismas mediante el sistema Phoenix<sup>TM</sup> Automated (Becton Dickinson).

El sistema automatizado Phoenix permite el análisis de cien test de identificación y el estudio de sensibilidad a los antibióticos al mismo tiempo, utilizando paneles combinados. Estos paneles constan de una bandeja de poliestireno sellada y autoinoculante con 136 micropocillos de reactivos liofilizados repartidos en dos áreas: un área destinada a la identificación, con 45 pocillos de sustratos bioquímicos liofilizados, más dos pocillos adicionales para controles fluorescentes; y un área destinada al antibiograma, con 84 pocillos de antibióticos liofilizados, más un pocillo adicional para el control de crecimiento (Figura 31).





**Figura 31. Sistema automatizado Phoenix, Becton Dickinson.**

Para la identificación y el antibiograma se realizó una dilución 0,5 de la escala MacFarland en caldo de identificación BD de los cultivos puros crecidos en agar sangre Columbia (BioMérieux), con la que se inocularon los paneles combinados.

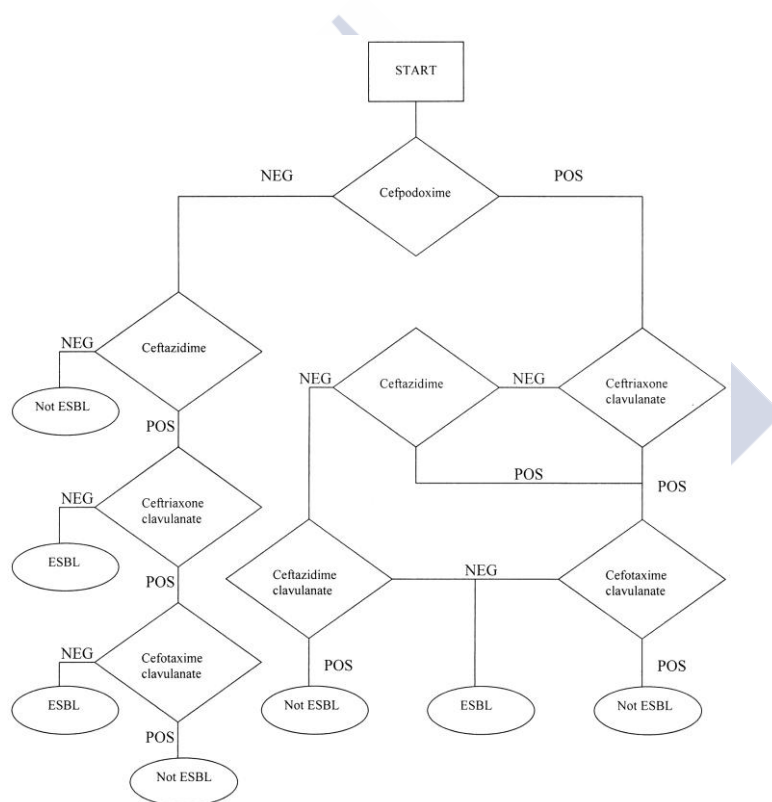
El Sistema Phoenix realiza mediciones continuas de los cambios de un indicador redox y de la turbidez para determinar el crecimiento bacteriano. Las sensibilidades antimicrobianas se establecen mediante el sistema de microdilución en caldo de cultivo, que consiste en la exposición de las bacterias a concentraciones decrecientes de antibióticos mediante diluciones seriadas 1:2. La concentración más baja de antibiótico en la que no se produce ningún tipo de crecimiento visible se define como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Para establecer las sensibilidades y resistencias para cada antimicrobiano se tomaron los valores de corte para las CMI indicadas por The Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2014). Valores de sensibilidad intermedios, no fueron considerados como resistencia.

Los antibióticos incluidos en todos los paneles fueron los siguientes: ampicilina (AM), imipenem (IPM), meropenem (MEM), cefazolina (CFZ), cefotaximo (CTX), ceftazidima (CAZ), cefepime (FEP), ceftazidima (FOX), aztreonam (ATM), amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), piperacilina/tazobactam (TZP), amikacina

(AN), gentamicina (GM), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), colistina (CL) y trimetoprim/sulfametoxazol (SXT). A mayores, por cambios en la composición de estos paneles, a 22 cepas se determinó también la CMI para piperacilina (PIP), cloranfenicol (C) y tetraciclinas (TE) y a las 72 cepas restantes se determinó a mayores ertapenem (ETP), fosfomicina (FF) y tobramicina (NN).

El sistema Phoenix considera sospechosas de producir BLEE aquellas colonias de *E. coli* que resultan positivas al siguiente diagrama de screening (Figura 32).



**Figura 32. Diagrama de screening de BLEE en el sistema Phoenix. Sanguinetti *et al.*, 2003.**

A los aislados BLEE se les realizó el test de sinergia con doble disco (Figura 33). Este método fue descrito por Jarlier *et al.*, 1988 y consiste en la disposición de un disco convencional de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg) en el centro de una

placa de Mueller Hinton agar a una distancia de 30 mm de otros discos con ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftriaxona (30 µg) y aztreonam (30 µg). Se incuba a 35°C durante 24±3h. La ampliación de alguno de los halos de inhibición hacia la amoxicilina/ácido clavulánico manifiesta la producción de BLEE.

Esta prueba ha sufrido diferentes modificaciones para aumentar su eficiencia, entre ellas la reducción o ampliación de las distancias entre los discos a 20 y a 40 mm, la utilización de cefalosporinas de cuarta generación, esencialmente la cefepima en lugar de la ceftriaxona y la valoración del halo de inhibición de cada antibiótico según The Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2014).



Figura 33. Test de sinergia con doble disco (Jarlier *et al.*, 1988) y medio chromID™ ESBL

Otro medio fenotípico utilizado para el cribado de enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido es el medio chromID™ ESBL (BioMérieux). Este medio cromogénico está constituido por una base nutritiva rica que asocia diferentes peptonas, una mezcla de antibióticos, entre ellos la cefpodoxima que permite el crecimiento selectivo de enterobacterias productoras de BLEE, dos sustratos cromogénicos y un sustrato natural que permite la identificación directa de *E. coli*

BLEE por la coloración espontánea de rosa a burdeos de las cepas productoras de  $\beta$ -glucoronidasa (Figura 33).

### 3.6.2 *Serotipado*

La determinación de los antígenos O y H de las cepas se realizó siguiendo la metodología originalmente descrita por Guinée y colaboradores (1981) modificada y adaptada en el LREC-USC.

#### 3.6.2.1 *Antígeno O*

La determinación del antígeno O de las cepas se llevó a cabo mediante la técnica de microaglutinación. Para ello se emplearon los 176 antisueros O capaces de reaccionar específicamente con los antígenos O1 a O185 de *E. coli*. Dichos antisueros se obtuvieron en el LREC inmunizando a conejos con las cepas de referencia correspondientes y fueron absorbidos para eliminar las reacciones cruzadas causantes de falsos positivos. Los 176 antisueros O monovalentes se repartieron en 24 antisueros O polivalentes (A-X) formados por 6 ó 7 antisueros monovalentes. La dilución final de los antisueros monovalentes en el antisero polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/40 ó 1/80).

#### **Preparación de las suspensiones bacterianas**

- Sembrar la cepa problema en medio TSA e incubar (37°C/18 h).
- Suspender las bacterias en 2 ml de solución salina (0,85% ClNa, p/v) y ajustar la concentración bacteriana ( $1,8 \times 10^9$  bacterias/ml) por comparación con el tubo número 6 de la escala de Mc Farland.

- Calentar las suspensiones a 100°C/1 h en un baño de agua para inactivar el antígeno K en el caso de que la cepa posea cápsula y desenmascarar el antígeno O.
- Una vez enfriadas las suspensiones, añadir a cada tubo 2 ml de solución salina formalinizada (0,5%, v/v) con violeta de genciana (0,005%, p/v). Conservar las suspensiones bacterianas a 4°C durante un máximo de 2 semanas.
- Algunas cepas de los serogrupos O8, O9, O20 y O101 se caracterizan por tener una variedad de antígeno K que es termorresistente, que necesita una exposición a 121°C/2,5 h para su inactivación. Por ello, si la cepa problema da un resultado negativo después de enfrentarla con todos los antisueros, se preparará una segunda suspensión que se autoclavará a 121°C/2,5 h para enfrentarla con los antisueros O8, O9, O20 y O101.

#### **Determinación presuntiva del serogrupo O**

- Enfrentar las suspensiones calentadas a 100°C/1 h con los 24 antisueros polivalentes y las tratadas a 121°C/2,5 h con los antisueros monovalentes O8, O9, O20 y O101 a la dilución de ensayo. Para ello, añadir a 50 µl de cada antisuero 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida. Tapar la placa e incubar (37°C/18 h).
- Si la cepa bacteriana da aglutinación con alguno de los antisueros polivalentes empleados, se realiza a continuación el mismo proceso con los antisueros O monovalentes incluidos en el suero polivalente correspondiente. Realizar la confirmación del serogrupo O con las cepas que hayan sido aglutinadas por uno o

más antisueros O monovalentes. Si la cepa es negativa con todos los antisueros se considera no tipable (ONT).

En los pocillos positivos, la aglutinación provoca la formación de una película que impide la sedimentación de las bacterias. En los pocillos negativos, las bacterias sedimentan dando lugar a la formación de unos acúmulos de bacterias que se visualizan en forma de botones azulados (Figura 34).

### **Confirmación del serogrupo O**

La determinación del antígeno O se completa con la confirmación del antígeno mediante titulación, según se describe a continuación:

- Colocar 50 µl de solución salina en todos los pocillos de cada fila, excepto en el nº1.
- Añadir a los pocillos nº 1 y nº 2 de cada fila 50 µl de la dilución de ensayo del antisuero O correspondiente. Hacer diluciones seriadas (1:2) transfiriendo 50 µl de la mezcla del pocillo nº 2 al nº 3, mezclando y repitiendo la operación hasta llegar al pocillo nº 10. Utilizar los pocillos 11 y 12 como controles negativos, desechando los 50 µl que sobran después de mezclar en el pocillo nº 10.
- Añadir 50 µl de la suspensión bacteriana calentada, formalinizada y teñida a los 12 pocillos de cada fila, empezando por el nº 12 y avanzando hasta el nº 1. Tapar las placas e incubar (37°C/18 h) y realizar la lectura de los resultados determinando los títulos.

El título será la máxima dilución del antisuero O que impide la sedimentación de las bacterias.

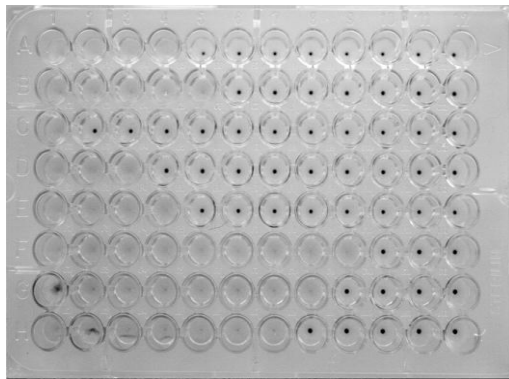


Figura 34. Determinación del antígeno O y titulación.

#### 3.6.2.2 *Antígeno H*

La determinación del antígeno H de las cepas se llevó a cabo mediante la técnica de aglutinación en tubo. Para ello se emplearon 53 antisueros (H1 a H56) que fueron obtenidos en el LREC mediante inmunización de conejos con las cepas de referencia correspondientes.

Los sueros extraídos de los animales se absorben para eliminar las posibles reacciones cruzadas. Además de los antisueros H monovalentes, se dispone de 9 antisueros H polivalentes formados por 5 o 6 de los antisueros monovalentes, en los que la dilución final de los antisueros individuales en el polivalente coincide con la dilución de ensayo (1/200).

#### **Expresión flagelar y movilidad**

- Cultivar las cepas problema en TSA e incubar (37°C/18 h).

- Dar a las cepas tres pases consecutivos (37°C/48 h) en tubos en forma de "U" con 5 ml de medio para movilidad (medio semisólido MIL, Difco) con objeto de potenciar la expresión de los flagelos. Para ello se siembra por picadura uno de los extremos del tubo. Si la cepa es móvil y ha alcanzado el extremo opuesto del tubo en "U", continuar el proceso. En caso contrario, dar seis nuevos pases y, si continúa siendo inmóvil, se considerará cepa no móvil (HNM).
- Del tubo en "U", recoger crecimiento bacteriano del extremo opuesto al sembrado inicialmente y transferir a 7 ml de infusión de cerebro-corazón (Difco) e incubar (37°C/6-8 h/80 rpm).
- Añadir a los cultivos obtenidos 7 ml de solución salina (0,85%, p/v) formalinizada (0,5 %, v/v) sin violeta de genciana y dejar los tubos a temperatura ambiente una noche. La turbidez de los tubos tratados con solución salina formalinizada debe ser comparable a la del tubo nº 2 de la escala de Mc Farland (6,0 x 10<sup>8</sup> bacterias/ml).

### **Determinación del antígeno H**

- Utilizar 10 tubos de vidrio tipo Kahn para cada cepa problema. Dispensar 500µl de cada uno de los nueve antisueros H polivalentes diluidos a 1/200 en los nueve primeros tubos, y 500 µl de solución salina (0,85%, p/v) en el décimo tubo que servirá como control negativo. A continuación, añadir 500 µl de la suspensión bacteriana formalinizada obtenida en el apartado anterior, e incubar en baño de agua (45°C/2h).
- Realizar la lectura de los resultados. La aglutinación se traduce en la formación de una película en el fondo del tubo, con el sobrenadante transparente. En los cultivos negativos la falta de aglutinación supone que el sobrenadante continua



turbio. Si no hay aglutinación con ninguno de los antisueros polivalentes, se considera que tiene un antígeno H no tipable (HNT).

- Si hay reacción positiva con alguno de los antisueros polivalentes, enfrentar la suspensión bacteriana con los antisueros monovalentes incluidos en el mismo. Para ello, dispensar 500µl de cada antisuero H monovalente en tubos tipo Kahn y a continuación añadir 500 µl de la suspensión bacteriana problema a cada uno de ellos. El tubo en el que se observe una reacción aglutinante nos indicará el antígeno H de la cepa problema.

### 3.7 *Tratamiento estadístico*

Para determinar el grado de asociación y las diferencias estadísticamente significativas entre las variables en estudio, se aplicó el test exacto de Fisher, considerando significativos valores inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Se evaluaron como posibles factores de riesgo en el desarrollo de cepas productoras de BLEE el tipo de producción de la explotación (broiler, gallinas ponedoras, gallinas reproductoras y pavos de engorde), el censo de la misma, la edad (en semanas) de los animales muestreados y el tipo de instalación. El tipo de instalación se valoró como términos de interacción entre el tipo de producción y esta variable (reproductoras x jaula, reproductoras x suelo, ponedoras x jaula y ponedoras x suelo).

El análisis se realizó mediante regresión logística. Dado que varias explotaciones contaban con diferentes manadas se emplearon estimadores robustos de la varianza para controlar posibles efectos de agrupamiento entre las mismas manadas de una explotación.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se recogieron y analizaron 460 muestras distribuidas de la siguiente forma según el tipo de producción: en granjas de broilers se procesaron 103 muestras de calzas, en pavos de engorde 20 muestras de calzas, en explotaciones de gallinas ponedoras 34 muestras de calzas y 36 muestras de heces y en granjas de aves reproductoras 239 muestras de calzas y 28 muestras de heces (Figura 35).

En todas las muestras se determinó la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE (CTX-M y SHV) y la presencia del grupo clonal ST131.

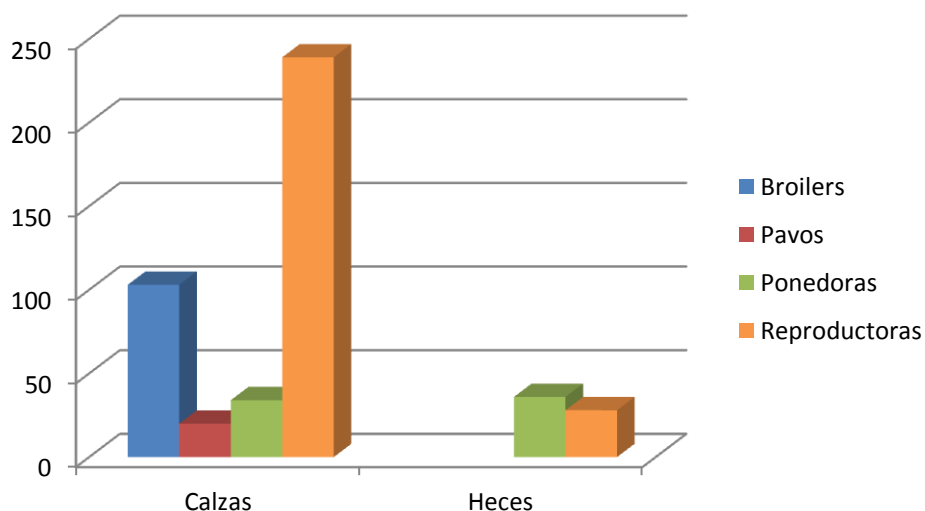


Figura 35. Tipos de muestras recogidas según el tipo de producción de la explotación.

En las tablas 22 y 23 se muestran las características de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE y del grupo clonal ST131 que se han aislado en este estudio.



Tabla 22. Características de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE de este estudio y explotaciones en las que se aislaron.

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO Clermont <i>et al.</i> , 2000/2013	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
FV19215-57 G a	1	B	O8:H34	CTX-M-32	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX	<i>fimH</i>	0	CH7-23	NR
FV19216-58 G a	2	B	O51:H4	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	0	CH4-32	ST155 (cc155)
FV19217-58 G c	2	B	O45:H9	CTX-M-1	A/C	AM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA cvaC iss traT ompT</i>	0	CH4-39	ST88 (cc23)
FV19305-438 G a	3	R	O8:HNM	CTX-M-1	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	0	CH7-25	NR
FV19218-62 G a	3	R	O60:H28	CTX-M-1	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH65-32	ST162 (cc469)
FV19220-76 G a	4	B	O51:H10	CTX-M-32	A/A	GM, AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH</i>	0	CH4-305	NR
FV19277-290 G a	5	R	O135:HNM	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iroN iss traT</i>	0	CH11-54	ST10 (cc10)
FV19221-80 G a	5	R	O8:H19	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	0	CH65-32	ST162 (cc469)
FV19222-84 G a	6	R	O161:H7	CTX-M-1	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss ompT</i>	0	CH95-31	ST351
FV19223-92 G a	7	B	O159:H21	CTX-M-1	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 traT ompT</i>	0	CH6-25	NR

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19224-92 G b</b>	7	B	ONT:H28	CTX-M-1	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	0	CH29-33	ST-NUEVO
<b>FV19225-92 G c</b>	7	B	O25:H51	CTX-M-1	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH</i>	0	CH4-41	NR
<b>FV19226-97 G a</b>	8	B	O20:H21	CTX-M-14	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	0	CH41-35	ST359
<b>FV19227-101 G a</b>	9	B	O171:H4	CTX-M14LIKE	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 papC papEF papGII fyuA</i>	0	CH11-93	ST10 (cc10)
<b>FV19229-105 G a</b>	10	B	O55,19:HNM	CTX-M-9	B1/B1	GM, AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN traT</i>	0	CH29-38	ST156 (cc156)
<b>FV19230-105 G b</b>	10	B	O60:H19	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iucD iutA iss traT ompT</i>	0	CH65-32	NR
<b>FV19231-105 G c</b>	10	B	O27:H12	SHV-12	A/A	AM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH fimAvMT78</i>	0	CH11-54	ST10 (cc10)
<b>FV19232-106 G a</b>	11	B	O44:H39	CTX-M-1	D/E	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH chuA traT ompT</i>	0	CH23-121	NR
<b>FV19233-106 G b</b>	11	B	O44:H39	CTX-M-32	D/E	GM, AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH chuA ompT</i>	0	CH23-121	NR
<b>FV19234-109 G a</b>	12	B	O146:H4	SHV-12	D/F	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH iucD iroN fyuA chuA cvaC iss traT malX</i>	0	CH45-97	NR

## Resultados y discusión

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO Clermont <i>et al.</i> , 2000/2013	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<i>ompT</i>										
<b>FV19235-110 G a</b>	13	B	ONT:HNM	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX	<i>ompT</i>	0	CH174-NEG	NR
<b>FV19236-110 G b</b>	13	B	O9:H31	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iucD iutA iss traT malX ompT</i>	0	CH4-31	ST533
<b>FV19237-110 G c</b>	13	B	O88:HNM	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX	<i>fimH traT ompT</i>	0	CH153-39	NR
<b>FV19238-126 G a</b>	14	B	O9:H10	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH papC iroN usp</i>	0	CH65-NT	NR
<b>FV19239-131 G a</b>	15	R	O2:HNM	CTX-M-14	B2/B2	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 yfcV tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH39-2	ST135
<b>FV19240-131 G b</b>	15	R	ONT:H21	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH</i>	0	CH4-32	ST155 (cc155)
<b>FV19242-164 G b</b>	16	R	O147:HNM	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	0	CH11-24	ST608
<b>FV19252-212 G a</b>	16	R	O161:H15	CTX-M-1	D/D	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH chuA traT ompT</i>	0	CH36-93	NR
<b>FV19253-212 G b</b>	16	R	ONT:H10	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH fyuA traT ompT</i>	0	CH6-289	ST1389

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
FV19243-173 G a	17	R	O120:H4	CTX-M-1	B2/B2	AM, ATM, CFZ, CTX	<i>fimH fimAvMT78 yfcV tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST428
FV19244-180 G a	18	R	O45:H25	CTX-M-1	D/E	AM, CFZ, CTX	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA iss traT ompT</i>	0	CH31-27	ST57 (cc350)
FV19245-187 G a	19	B	O91:H7	CTX-M-1	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH sat hlyF iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	0	CH95-32	ST1304
FV19246-191 G a	20	B	O116:HNM	CTX-M-14	A/A	AM, CFZ, FOX, CTX, FEP, AMC	<i>fimH tsh</i>	0	CH282-24	ST1818
FV19247-191 G b	20	B	O101:HNM	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH fimAvMT78 hlyF traT</i>	0	CH11-54	ST744 (cc10)
FV19248-192 G a	21	B	O153:H10	CTX-M-32	A/A	GM, AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 fyuA traT</i>	0	CH11-54	ST10 (cc10)
FV19249-193 G a	22	B	O60:H28	CTX-M-1	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH65-32	NR
FV19250-204 G a	23	P	O2:H1	CTX-M-1	B2/B2	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH fimAvMT78 yfcV hlyF vat iroN fyuA chuA kpsM II-K5 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	0	CH39-2	NR
FV19251-209 G a	24	B	ONT:H39	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CAZ	<i>fimH papC</i>	0	CH11-27	NR

## Resultados y discusión

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19254-214 G a</b>	25	B	O35:H27	CTX-M-1	D/E	AM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH fimAvMT78 papEF papGII cnf1 hlyF iucD iutA iroN chuA iss traT ompT</i>	1	CH31-54	ST350 (cc350)
<b>FV19255-215 G a</b>	26	B	O26:[H10]	CTX-M-32	D/E	GM, AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, FEP, CIP, LVX	<i>fimH papC papEF papGII chuA traT</i>	0	CH276-108	NR
<b>FV19256-215 G b</b>	26	B	O2:H29	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	0	0	CH11-NEG	NR
<b>FV19257-216 G a</b>	27	B	ONT:H4	CTX-M-1	D/F	AM, CFZ, CTX	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	1	CH4-58	ST648 (cc648)
<b>FV19258-216 G b</b>	27	B	O11:H12	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX	<i>pacC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA kpsM II-K5 cvaC iss traT</i>	1	CH11-NEG	ST93 (cc168)
<b>FV19259-240 G a</b>	28	R	O106:HNM	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	0	CH27-30	NR
<b>FV19260-244 G a</b>	29	B	ONT:H51	SHV-12	A/C	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	0	CH4-24	ST410 (cc23)
<b>FV19261-248 G a</b>	30	R	O2:H11	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CAZ, SXT	<i>fimH iucD iroN cvaC iss ompT</i>	0	CH4-31	ST345



CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19263-252 G a</b>	31	R	O1:H42	CTX-M-9	D/F	AM, CFZ, CTX	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT malX ompT</i>	1	CH4-58	ST648 (cc648)
<b>FV19265-261 G b</b>	32	B	ONT:H4	CTX-M-14b	D/F	AM, CFZ, CTX, SXT	<i>fimH papC papEF papGII hlyF vat iucD iutA fyuA chuA iroN cvaC iss traT malX</i>	1	CH45-97	ST117
<b>FV19266-262 G a</b>	33	B	O7:H4	CTX-M-14	A/A	AM, CFZ, CTX, CIP	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC iss traT ompT</i>	1	CH11-31	ST93 (cc168)
<b>FV19267-262 G b</b>	33	B	O82:H21	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, CIP, LVX	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH19-NT	ST1800
<b>FV19268-262 G c</b>	33	B	O54:H21	CTX-M-9	D/F	AM, CFZ, CTX, CIP, LVX, SXT	<i>fimH papC papEF papGII sat hlyF vat iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT malX ompT</i>	1	CH45-97	ST117
<b>FV19269-263 G a</b>	34	B	O7:H15	CTX-M-2*	D/E	AM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT</i>	0	CH26-3	ST38 (cc38)
<b>FV19272-271 G a</b>	35	B	O8:HNM	SHV-12	A/A	AM, CFZ,	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	0	CH7-25	NR

## Resultados y discusión

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19273-279 G a</b>	36	R	O21:H32	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX	<i>fimH traT ompT</i>	0	CH11-23	NR
<b>FV19274-289 G a</b>	37	B	O20:H21	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, FOX, CTX, CAZ, AMC, CIP, LVX, <b>CMY-2</b>	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	0	CH41-35	ST359
<b>FV19275-289 G b</b>	37	B	O8:H4	CTX-M-9	D/F	AM, CFZ, CTX	<i>fimH tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA iss traT malX ompT</i>	0	CH45-97	NR
<b>FV19281-308 G b</b>	38	R	ONT:H31	CTX-M-1	B2/E	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH chuA traT</i>	0	CH224-NT	NR
<b>FV19282-321 G a</b>	39	B	ONT:H4	CTX-M-1	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH11-NT	ST3525
<b>FV19283-321 G b</b>	39	B	ONT:H32	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CAZ	<i>fimH</i>	0	CH11-23	NR
<b>FV19284-322 G a</b>	39	B	O20:H14	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	0	CH4-31	ST533
<b>FV19285-322 G c</b>	39	B	O159:H21	CTX-M-14b	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, SXT	<i>fimH fimAvMT78 traT ompT</i>	0	CH6-25	NR
<b>FV19286-322 G d</b>	39	B	O125:H25	SHV-12	D/E	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN chuA iss traT</i>	0	CH31-27	NR
<b>FV19287-334 G a</b>	40	B	O18:H21	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	0	CH19-86	ST602 (cc446)
<b>FV19288-334 G d</b>	40	B	O109:H45	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CAZ	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iucD iutA iroN iss</i>	0	CH11-NT	ST542

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19289-338 G a</b>	41	B	O85,132:H10	SHV-2	A/A	GM, AM, CFZ, CIP, LVX	<i>fimH fyuA traT</i>	0	CH27-41	NR
<b>FV19290-341 G a</b>	42	B	O22:H19	CTX-M-1	B1/B1	AM, CFZ, CTX, CIP, LVX	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	0	CH65-32	ST1431
<b>FV19291-341 G c</b>	42	B	ONT:H27	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH fimAvMT78 tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	0	CH65-276	ST297
<b>FV19292-358 P a</b>	43	Pa	O91:H28	CTX-M-1	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	1	CH19-38	ST-NUEVO
<b>FV19293-373 G a</b>	44	R	O106:HNM	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	0	CH27-30	NR
<b>FV19294-375 G a</b>	45	R	O101:[H10]	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH11-23	ST1684
<b>FV19300-417 G a</b>	45	R	O101:[H10]	CTX-M-1	A/A	AN, AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH11-23	ST1684
<b>FV19296-397 G a</b>	46	R	O91:H7	CTX-M-1	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	0	CH95-32	NR
<b>FV19297-397 G b</b>	46	R	O173:HNM	SHV-12	B1/B1	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH traT ompT</i>	0	CH95-121	NR
<b>FV19298-412 G a</b>	47	R	O101:[H10]	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	0	CH11-23	ST1684
<b>FV19299-412 G b</b>	47	R	O45:HNM	CTX-M-1	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH</i>	0	CH94-23	NR

## Resultados y discusión

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	FILOGRUPO <small>Clermont et al., 2000/2013</small>	PERFIL RESISTENCIA	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19302-424 G a</b>	48	R	ONT:HNM	SHV-2	A/A	AM, CFZ, SXT	<i>fimH cvaC traT ompT</i>	0	CH11-400	ST48 (cc10)
<b>FV19303-425 G a</b>	48	R	ONT:H11	CTX-M-1	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH</i>	0	CH7-54	ST-NUEVO
<b>FV19304-432 G a</b>	49	R	O8:H11	CTX-M-1	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iroN traT</i>	0	CH11-54	ST48 (cc10)
<b>FV19306-450 G a</b>	50	B	O8:H4	SHV-12	D/F	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH hlyF vat iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT malX ompT</i>	0	CH486-97	ST3778
<b>FV19307-458 G a</b>	51	B	ONT:HNM	CTX-M-32	D/F	AM, CFZ, CTX, FEP	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	1	CH4-58	ST648 (cc648)
<b>FV19308-458 G b</b>	51	B	ONT:H18	CTX-M-14	A/A	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX, SXT	<i>fimH hlyF iucD iutA cvaC iss traT</i>	0	CH11-167	NR
<b>FV19309-458 G c</b>	51	B	ONT:H51	CTX-M-14	B1/B1	AM, CFZ, CTX, FEP, CIP, LVX	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss</i>	0	CH4-32	ST155 (cc155)
<b>FV19310-458 G d</b>	51	B	ONT:H51	SHV-12	A/C	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ, CIP, LVX	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	0	CH4-24	ST410 (cc23)
<b>FV19311-459 G a</b>	52	B	ONT:H2	SHV-12	A/A	AM, ATM, CFZ, CTX, CAZ	<i>fimH fimAvMT78</i>	0	CH11-54	ST10 (cc10)

cc: Complejo clonal. NR: No realizado.

**Tabla 23. Cepas de *E. coli* del grupo clonal ST131 de este estudio y explotaciones en las que se aislaron.**

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA Y <i>AmpC</i>	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19241-162 G a</b>	53	R	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ, FOX, CTX, CAZ, AMC <b>CMY-2</b>	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19264-261 G a</b>	32	B	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ, FOX, CTX, CAZ, AMC <b>CMY-2</b>	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19271-263 G c</b>	34	B	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ, FOX, CTX, CAZ, AMC <b>CMY-2</b>	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19276-289 G c</b>	37	B	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ, FOX, CTX, AMC <b>CMY-2</b>	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19278-291 G a</b>	54	R	O25b:H4	B2/B2	GM, AM, CFZ	<i>fimH yfcV hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19279-305 G a</b>	38	R	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ	<i>fimH yfcV hlyF iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC traT ibeA malX usp ompT</i>	0	CH40-22	ST131
<b>FV19280-308 G a</b>	38	R	O25b:H4	B2/B2	CFZ	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19295-375 G b</b>	45	R	O25b:H4	B2/B2	AM, CFZ	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131

## Resultados y discusión

CEPAS	Nº DE EXPLOTACIÓN	TIPO DE PRODUCCIÓN	SEROTIPO	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	PERFIL RESISTENCIA Y <i>AmpC</i>	PERFIL VIRULENCIA	ExPEC	CLONOTIPO	MLST
<b>FV19301-417 G b</b>	45	R	O25b:H4	B2/B2	AN, CFZ, CIP	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131
<b>FV19219-63 G a</b>	55	R	O25b:H4	B2/B2	CFZ, CTX	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	1	CH40-22	ST131

cc: Complejo clonal. NR: No realizado.

## 4.1 *E. coli* productores de BLEE

### 4.1.1 Prevalencia

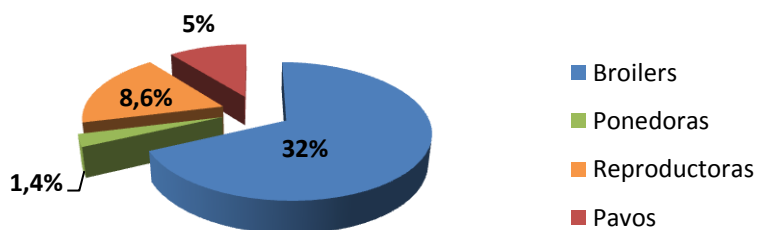
En este estudio se investigó la presencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de los tipos CTX-M y SHV.

De acuerdo al modelo de regresión empleado sólo la variable “tipo de producción” tiene influencia sobre la aparición de cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

Las prevalencias obtenidas varían en función de si se analizaban por muestras, manadas o explotaciones (Tablas 24 a 26 y Figuras 36 a 38).

**Tabla 24. Muestras analizadas y positivas a cepas de *E. coli* productoras de BLEE según el tipo de producción.**

	BROILERS	PONEDORAS	REPRODUCTORAS	PAVOS	TOTAL
Nº de muestras	103	70	267	20	460
Muestras positivas	33	1	23	1	58
Prevalencia (%)	32	1,4	8,6	5	12,6



**Figura 36. Prevalencia de cepas de *E.coli* productoras de BLEE en las muestras analizadas según el tipo de producción.**

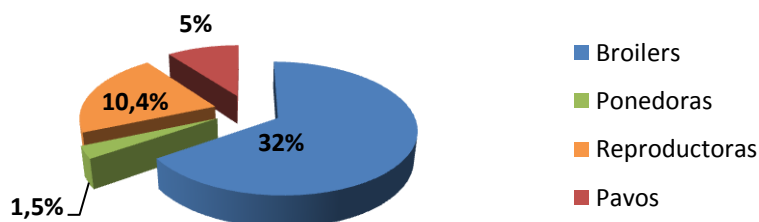
Así, en el caso del análisis de las muestras (Tabla 24 y Figura 36), la positividad es significativamente mayor en broilers (32,0%) que en reproductoras (8,6%) y

ponedoras (1,4%) ( $p<0,001$ ), y que en pavos (5,0%) ( $p<0,01$ ). También, la positividad en las gallinas reproductoras (8,6%) es significativamente mayor que en ponedoras (1,4%) ( $p<0,05$ ).

Como se puede ver en la Tabla 25 y en la Figura 37 las prevalencias de cepas de *E. coli* productoras de BLEE obtenidas en manadas fueron muy similares a las encontradas en las muestras.

**Tabla 25. Número de manadas analizadas y manadas positivas a cepas de *E. coli* productoras de BLEE según el tipo de producción.**

	BROILERS	PONEDORAS	REPRODUCTORAS	PAVOS	TOTAL
Nº de manadas	103	65	201	20	389
Manadas positivas	33	1	21	1	56
Prevalencia (%)	32	1,5	10,4	5	14,4



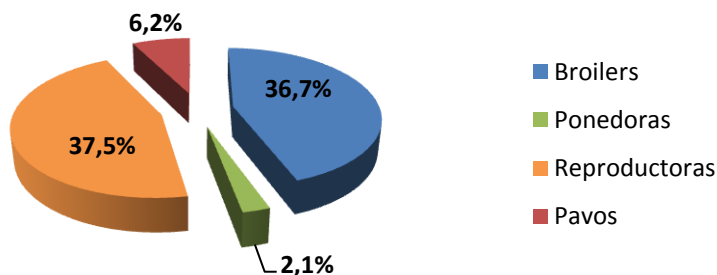
**Figura 37. Prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en las manadas analizadas según el tipo de producción.**

Los resultados obtenidos en las prevalencias por explotación difieren a los obtenidos por muestra y manada debido a la existencia de un mayor número de manadas y por lo tanto de muestras en las explotaciones de gallinas reproductoras. No existen diferencias significativas entre broilers (36,8%) y gallinas reproductoras (37,5%) ( $p>0,05$ ), pero si de ambos tipos de producción frente a gallinas ponedoras (2,1%) y pavos (6,2%) ( $p<0,001$  y  $p<0,05$  respectivamente) (Tabla 26 y Figura 38).



**Tabla 26. Número de explotaciones analizadas y positivas a cepas de *E. coli* productoras de BLEE según el tipo de producción.**

	BROILERS	PONEDORAS	REPRODUCTORAS	PAVOS	TOTAL
Nº de explotaciones	87	48	48	16	198
Explotaciones positivas	32	1	18	1	52
Prevalencia (%)	36,8	2,1	37,5	6,2	26,3



**Figura 38. Prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en las explotaciones muestreadas según el tipo de producción.**

Al estudiar la positividad en las granjas que fueron muestreadas dos o tres años en gallinas ponedoras y en broilers no observamos que esa positividad se repita a lo largo de los años. También se observó que en sólo dos explotaciones, una de broilers y otra de reproductoras las dos manadas de la explotación fueron positivas a BLEE en el mismo muestreo.

En cuanto al tipo de BLEE, para el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> obtuvimos una prevalencia del 70,2% mientras que para el gen *bla*<sub>SHV</sub> fue del 29,8%.

En las 52 explotaciones positivas se encontraron 84 cepas de *E. coli* productoras de BLEE; 55 cepas eran de broilers, 27 eran de reproductoras, 1 de pavos de engorde y la última cepa era de gallinas ponedoras.

En 21 explotaciones positivas se aislaron varias cepas de *E. coli* productoras de BLEE por explotación, de ellas, 14 granjas eran de broilers y siete de reproductoras.

En el resto de explotaciones positivas (31) sólo se encontró una cepa de *E. coli* productora de BLEE por explotación.

En las 52 explotaciones positivas se encontraron cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 56 manadas. De éstas, 33 correspondían a explotaciones de broilers, 21 de reproductoras (19 de multiplicación carne y dos de multiplicación huevos) y de las dos restantes, una era de pavos de engorde y otra de ponedoras.

De estas manadas, 33 (58,9%) portaban el gen *bla*<sub>CTX-M</sub> exclusivamente, 12 (21,4%) el gen *bla*<sub>SHV</sub> y las 12 manadas restantes (21,4%) eran portadoras de ambos tipos de genes.

Al analizar por años el porcentaje de granjas en las que se detectaba algún tipo de BLEE, no se observaron diferencias significativas, así, se obtuvieron prevalencias del 19,4%, 18,3% y 17,9% respectivamente desde el año 2010 hasta el año 2012.

Existen numerosos estudios que determinan prevalencias de *E. coli* productores de BLEE en aves de corral aparentemente sanas con resultados muy distintos según el área geográfica que se muestree. Así, en Suecia, Börjesson *et al.*, 2016 detectaron en broilers y gallinas ponedoras un porcentaje de BLEEs por muestra del 6% y 4,4% respectivamente, durante los años 2010 y 2012. En Brasil, Ferreira *et al.*, 2014 durante los años 2011 y 2012 también encontraron un porcentaje bajo de cepas BLEE por muestra, en torno al 9,5% en broilers.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en los Países Bajos por Blaak *et al.*, 2015 donde la positividad por muestra en broilers fue del 81% y en ponedoras del 65% durante los años 2011 y 2012. Igualmente Huijbers *et al.*, 2014 encontraron en Holanda durante los años 2010 y 2011 un 96,4% de cepas BLEEs por muestra en explotaciones de broilers. En Irak, Saeed 2014 detectaron un 76,1% de BLEEs en

muestras fecales de broilers sanos en el año 2013. En España, concretamente en Tenerife, Abreu *et al.*, 2013 también observaron porcentajes elevados (86,6%) en muestras fecales de broilers durante los años 2012 y 2013.

Nuestros resultados se asemejan más a los obtenidos en Túnez por Kilani *et al.*, 2015 donde obtuvieron en muestreos realizados en 2013 unos porcentajes de BLEEs en muestras fecales de broilers del 30%, sin embargo obtuvieron prevalencias mayores en muestras fecales de gallinas reproductoras, un 24% frente al 8,6% de nuestro estudio. También en Vietnam, en 2013, Ueda *et al.*, 2015 encontraron un 42,6% de BLEEs en muestras fecales de broilers de zonas rurales.

Dahms *et al.*, 2015 en Alemania obtuvieron resultados de presencia de cepas BLEE en el 75% de las explotaciones de broilers muestreadas durante el año 2012 y un 0% en explotaciones de pavos, si bien el número de explotaciones muestreadas fue de cuatro y dos respectivamente, mientras que en nuestro estudio fue del 36,8% en broilers y del 6,2% en pavos con un número mayor de explotaciones muestreadas.

Otros estudios realizados en granjas de pavos de engorde obtuvieron prevalencias del 5,2% por explotación en 337 granjas del Reino Unido durante los años 2006 y 2007 (Randall *et al.*, 2011). Dolejska *et al.*, 2011 observaron una prevalencia del 20% por explotación en 40 granjas de la República Checa durante el año 2006.

Estas diferencias entre los distintos estudios, se deberían a factores tales como la densidad de las explotaciones, el clima, las medidas de bioseguridad implementadas en la granja, las prácticas de higiene, la edad de los animales muestreados, el muestreo realizado, el procesado de las muestras, etc. (Dahms *et al.*, 2015; Börjesson *et al.*, 2016).

Comparando los porcentajes de cepas BLEE en las muestras analizadas de explotaciones de broilers con los obtenidos en carne de pollo el riesgo de contaminación cruzada en mataderos debe ser considerado (Carmo *et al.*, 2014, Olsen *et al.*, 2014). En los mataderos de aves existen puntos críticos que pueden afectar microbiológicamente al producto final. Para ello, se establece un plan de análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC) en las siguientes fases: traslado y recepción de aves, fase de descarga y colgado, fase de aturdimiento, fase de desangrado, fase de escaldado por inmersión, fase de desplumado, fase de eviscerado, corte de patas y cabezas, fase de lavado, fase de enfriamiento, fase de despiece, fase de envasado y fase de expedición y transporte.

La presencia de *E.coli* en el producto final puede ser debida a la contaminación de la propia granja del producto de partida, a la diseminación por traumatismos en el traslado de las aves al matadero, a la contaminación cruzada entre canales, al desangrado insuficiente por corte defectuoso, a desgarros en piel y hematomas durante el desplumado, al mal manejo del manipulador durante todo el proceso, al mal ajuste de los chorros de lavado, a las caídas de canales por un mal ajuste del equipo, y a la pérdida de la cadena de frío. También es importante controlar durante todo el proceso en el matadero el estado del agua utilizado y la temperatura de la misma. Para evitar todos estos peligros se establecen medidas preventivas en los mataderos que afectan a los proveedores, al plan de termorregulación, a la limpieza y desinfección, a la formación de los empleados, a la guía de buenas prácticas de higiene y al control del producto durante todo el proceso.

Así, en un estudio realizado por Herrera en 2015, en carne de pollo obtenida de puntos de venta para el consumidor en la ciudad de Lugo entre los años 2009 y 2010, determinó que el 45,5% (91 de 200 muestras) era portadora de cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Este resultado concuerda con el obtenido en nuestro estudio

en el cual la prevalencia en muestras de broilers en las explotaciones analizadas fue del 32%, lo que ratificaría la existencia de contaminación cruzada desde la explotación hasta la venta de la carne al consumidor.

Kawamura *et al.*, 2014 encontraron en el 2010 resultados similares, un 45,2%, en carne de pollo de Japón. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Börjesson *et al.*, 2016, en carne de pollo sueca donde obtuvieron un 4% en 2010 y un 19,3% en carne de pollo importada de Europa durante los años 2010-2013 y por Carmo *et al.*, 2014 que obtuvieron una prevalencia del 17,8% en carne de pollo danesa durante los años 2009 y 2011. Dinamarca al igual que otros países nórdicos ha tenido bajas prevalencias de resistencias a antimicrobianos debido al uso consciente y restrictivo de los mismos.

Por el contrario, los resultados obtenidos en los Países Bajos por Leverstein-van Hall *et al.*, 2011 y Overdeest *et al.*, 2011 durante los años 2010 y 2009 en carne de pollo fueron del 94% y del 79,8% respectivamente.

En lo que sí coinciden es al analizar carne de pollo importada, principalmente de Sudamérica donde los porcentajes de detección de BLEEs aumentan. Carmo *et al.*, 2014 observaron un 44,7% de BLEEs en la carne de pollo importada durante el periodo 2009-2011, Kawamura *et al.*, 2014 encontraron un 57,7% en 2010 y Börjesson *et al.*, 2016 detectaron un 90,7% en 2010 y 2011.

Dahms *et al.*, 2015 observaron que en los rebaños de broilers la detección de BLEE aumentaba durante el periodo de engorde. En nuestro estudio la mayoría de las muestras se obtuvieron al final de este periodo, por lo que la prevalencia obtenida puede ser mayor a la que hubiéramos observado a la entrada de los animales en la explotación. En este sentido, Olsen *et al.*, 2014 detectaron un incremento de la

presencia de BLEE durante el periodo de producción. También, Dierick *et al.*, 2013 describieron una alta prevalencia en broilers de seis semanas de edad (pocos días antes de ir al matadero). Las cepas BLEE se encuentran en cada nivel de la producción piramidal de broilers. En las granjas de producción de broilers esos aislados se extienden rápidamente, provocando altas prevalencias. La transmisión vertical, tanto como la recirculación de esas cepas en las granjas e incubadoras pueden jugar un rol muy importante. Por este motivo, se deberían implementar programas de erradicación tanto en las granjas de broilers como incubadoras y granjas de cría (Dierick *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2014).

#### 4.1.2 *Tipado de enzimas BLEE*

De las 84 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas, 59 cepas (70,2%) eran portadoras de genes tipo *bla*<sub>CTX-M</sub> y 25 cepas (29,8%) de genes de tipo *bla*<sub>SHV</sub>.

Mediante secuenciación se determinaron los siguientes tipos de enzimas BLEE: CTX-M-1 (33 cepas, 39,2%), CTX-M-2 (1 cepa, 1,2%), CTX-M-9 (4 cepas, 4,8%), CTX-M-14 (12 cepas, 14,3%), CTX-M-14b (2 cepas, 2,4%), CTX-M-32 (6 cepas, 7,1%), SHV-2 (2 cepas, 2,4%) y SHV-12 (23 cepas, 27,4%).

Al hacer la secuenciación se vio que había una cepa del subgrupo CTX-M9 con un 99% de identidad con CTX-M-14, pero con un cambio de nucleótido en la posición 355 que da cambio aminoacídico. Se trataría de un nuevo tipo de enzima BLEE (Tabla 27).

Al valorar estadísticamente los tipos de BLEE encontrados en este estudio se obtuvieron valores estadísticamente significativos ( $p < 0,01$ ) en el tipo CTX-M-1 entre broilers y reproductoras, siendo más prevalente en reproductoras.

**Tabla 27. Distribución de los distintos tipos de BLEE según el tipo de producción de las explotaciones.**

TIPO DE BLEE	BROILERS		PAVOS		PONEDORAS		REPRODUCTORAS		Total	%
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
CTX-M-1	14	25,5	1	100	1	100	17	63	33	39,3
CTX-M-32	6	10,9							6	7,1
CTX-M-2	1	1,8							1	1,2
CTX-M-9	3	5,5					1	3,7	4	4,8
CTX-M-14-like (new)	1	1,8							1	1,2
CTX-M-14	10	18,2					2	7,4	12	14,3
CTX-M-14b	2	3,6							2	2,4
SHV-2	1	1,8					1	3,7	2	2,4
SHV-12	17	30,9					6	22,2	23	27,4
Total	55	100	1	100	1	100	27	100	84	100,0

Nuestros resultados concuerdan con Ewers *et al.*, 2012 donde observaron que en Europa el tipo de BLEE más prevalente en aves de corral era CTX-M-1 seguido de SHV-12. Blaak *et al.*, 2015 también obtuvieron las prevalencias más altas en los genes blaCTX-M-1 (41%) y blaSHV-12 (29%) en granjas holandesas de gallinas ponedoras y de broilers durante los años 2011 y 2012. Kilani *et al.*, 2015, en Túnez, encontraron en granjas de reproductoras y de broilers que todas las cepas BLEE, excepto una, albergaban el gen blaCTX-M-1. Carmo *et al.*, 2014 encontraron en carne de broiler danesa que el genotipo más prevalente de las cepas BLEE era CTX-M-1.

No obstante, los resultados obtenidos en esta tesis difieren con los resultados encontrados por Ferreira *et al.*, 2014, ya que el genotipo más prevalente en explotaciones de broilers en Brasil fue CTX-M-2 al igual que ocurre en muestras de origen humano de este país.

Cuando comparamos los tipos de enzimas BLEE de las cepas aviares fecales de esta tesis con los encontrados en cepas causantes de bacteriemias en pacientes humanos del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) de la Tesis de Rosalía S. Mamani (Mamani, 2014) y con los de las cepas aisladas de carne de pollo adquirida en establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo de la Tesis de Alexandra Herrera (Herrera, 2015), nos encontramos que tanto en las cepas aviares fecales como en las de carne de pollo las enzimas predominantes eran CTX-M-1, CTX-M-14 y SHV-12, mientras que en las cepas bacteriémicas humanas las enzimas predominantes fueron CTX-M-14 y CTX-M-15 (Tabla 28).

**Tabla 28.** Comparación entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE fecales aviares de esta tesis con las causantes de bacteriemias en humanos (Mamani, 2014) y con las cepas de carne de pollo (Herrera, 2015).

TIPO DE BLEE	Bacteriémicas humanas n=96		Aviares fecales n=84		Aviares carne n=127		Valor de p Humanas vs Aviares fecales	Valor de p Aviares fecales vs Aviares carne
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
CTX-M-1	8	8,3	33	39,2	27	21,3	<0,001	0,004
CTX-M-2	0	0,0	1	1,2	0	0,0		
CTX-M-9	4	4,2	4	4,8	18	14,2		0,02
CTX-M-14	36	37,5	14	16,7	32	25,2	0,001	
CTX-M-15	40	41,7	0	0,0	0	0,0	<0,001	
CTX-M-24	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
CTX-M-32	4	4,2	6	7,1	15	11,8		
CTX-M-NT	0	0,0	1	1,2	6	4,7		
SHV-2	0	0,0	2	2,4	0	0,0		
SHV-12	4	4,2	23	27,4	28	22,0	<0,001	
SHV-NT	0	0,0	0	0,0	1	0,8		



#### 4.1.3 *Resistencias fenotípicas*

Se realizó el estudio de sensibilidad de las 84 cepas de *E.coli* productoras de BLEE, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 17 antibióticos, mediante el sistema automatizado Phoenix de Becton Dickinson en la Unidad de Bacteriología do Laboratorio de Sanidade e Producción animal de Galicia (LASAPAGA).

Analizando las prevalencias de resistencia por antimicrobiano, dentro de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos el 100% de las muestras fueron resistentes a ampicilina y cefazolina, el 91,7% fueron resistentes a cefotaxima, el 56% a cefepime, el 47,6% a aztreonam, el 28,6% a ceftazidima y el 2,3% a cefoxitina.

Al analizar las resistencias asociadas, se obtuvieron con el trimetropim-sulfametoxazol valores del 33.3%, con ciprofloxacina y levofloxacina del 32.1% y el 31%, con gentamicina y amikacina del 7,1% y del 1,2% y con amoxicilina-clavulánico del 2,3%.

Para los antibióticos imipenem, meropenem, piperacilina-tazobactam y colistina no se observaron resistencias.

Por cambio en la composición de los paneles de Becton Dickinson, en 21 cepas se estudió a mayores la sensibilidad frente a cloranfenicol, tetraciclina y piperacilina obteniéndose resistencias del 13,6%, 81,8% y 91% respectivamente.

A las 63 cepas restantes se les realizó a mayores la CMI para fosfomicina, ertapenem y tobramicina obteniéndose sólo resistencia a la tobramicina con un 4.7%.

Se analizaron los porcentajes de resistencia según la aptitud de la explotación, como muestra la tabla 29. Se obtuvieron diferencias significativas,  $p < 0.01$ , en el caso de la

ciprofloxacina (45,5% vs 7,4%) y la levofloxacina (43,6% vs 7,4%) entre broilers y reproductoras.

**Tabla 29. Prevalencias de resistencia en las cepas de *E. coli* productoras de BLEE en granjas de broilers y reproductoras.**

ANTIBIÓTICOS	BROILERS		REPRODUCTORAS	
	Nº cepas	%	Nº cepas	%
AMPICILINA	55	100	27	100
CEFAZOLINA	55	100	27	100
CEFOXITINA	2	3,6	0	0,0
CEFOTAXIMA	49	89,1	25	92,6
CEFTAZIDIMA	18	32,7	6	22,2
CEFEPIME	29	52,7	16	59,3
AZTREONAM	26	47,3	13	48,1
AMC	2	3,6	0	0,0
AMIKACINA	0	0,0	1	3,7
GENTAMICINA	6	10,9	0	0,0
CIPROFLOXACINA	25	45,5	2	7,4
LEVOFLOXACINA	24	43,6	2	7,4
SXT	21	38,2	6	22,2

Kilani *et al.*, 2015, en granjas de gallinas reproductoras, encontraron resultados de sensibilidad del 100% para la gentamicina y el imipenem, al igual que nuestro estudio. También estas granjas mostraban siempre el mismo patrón de resistencia a los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, trimetropim-sulfametoxazol, sulfonamidas, estreptomina, tetraciclina y norfloxacina. Sin embargo, en granjas de broilers no encontraron patrones de resistencias asociadas. Resultados no concordantes con los obtenidos por nuestro estudio.

Por el contrario en el trabajo de Ferreira *et al.*, 2014 encontraron que todos los aislados de broilers de dos explotaciones de Brasil portadores de cepas BLEE, mostraban resistencia al ácido nalidíxico, a la ciprofloxacina, levofloxacina y a las

tetraciclinas, además el 73.7% eran resistentes a la gentamicina y al trimetropin-sulfametoxazol.

Al comparar los resultados de nuestro estudio (Tabla 29) con los obtenidos en la Tesis Doctoral de Herrera (2015) (Tabla 30), se encontraron entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo un 100% de resistencia a ampicilina como en nuestro estudio. También se observaron resultados similares al analizar el porcentaje de resistencias a ciprofloxacina y trimetropim-sulfametoxazol, así en broilers los porcentajes fueron del 45,5% y 38,2% respectivamente y en carne de pollo fueron del 42,5% y del 31,5%. Y lo mismo podemos decir con respecto a la cefoxitina y a la amoxicilina-ácido clavulánico que en broilers fue 3,6% en ambos casos y en las cepas de carne de pollo 2,4% y 3,1 % respectivamente. Por el contrario se encontraron mayores prevalencias en las cepas aisladas de carne de pollo en relación a la fosfomicina con un 2,4 % y a la gentamicina con un 22,0% frente a nuestros resultados del 0% (en las 63 cepas analizadas) y del 10,9% respectivamente.

**Tabla 30. Prevalencia de resistencias a antibióticos en cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo en la ciudad Lugo entre los años 2009 y 2010 (Herrera, 2015).**

ANTIBIÓTICOS	<i>E. coli</i> BLEE de carne de pollo (n=127)	
	Nº cepas	%
Penicilinas (Ampicilina)	127	100
Quinolonas (Ácido nalidíxico)	93	73,2
Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)	54	42,5
Trimetoprim-sulfametoxazol	40	31,5
Aminoglucósidos (Gentamicina)	28	22
Cefalosporinas (1ª a 4ª generación)	126	99,2
Cefalosporinas de espectro extendido	126	99,2
Inhibidores de $\beta$ -lactamasas (AMC)	4	3,1
Cefoxitina	3	2,4
Fosfomicina	3	2,4

Para describir y clasificar las bacterias que eran resistentes a varios antimicrobianos, un grupo de expertos internacionales coordinados por el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC) crearon una terminología internacional para describir estos aislados basándose en las indicaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y de las recomendaciones de la FDA (United States Food and Drug Administration). Así, MDR (*multidrug-resistant*) se define como aquel aislado que es resistente al menos a un agente antimicrobiano de tres o más categorías de antimicrobianos establecidas, el aislado se considera XDR (*extensively drug-resistant*) cuando es resistente al menos a un antimicrobiano de todas las categorías salvo dos o menos categorías, y PDR (*pandrug-resistant*) cuando el aislado es resistente a todos los antibióticos de todas las categorías (Tabla 31) (Magiorakos *et al.*, 2011).

Como todos nuestros aislados, excepto uno, fueron resistentes a un agente en tres o más categorías y todos fueron sensibles a un mínimo de antimicrobianos de tres categorías, todos quedarían definidos como *multidrug resistant* (MDR).

Se detectaron treinta patrones de resistencia, el patrón más prevalente fue el número 19 con 14 cepas (17%) resistentes a cuatro antibióticos (ampicilina, cefazolina, cefotaxima y cefepime), de esas 14 cepas, una era de pavos de engorde, cinco de broilers y las ocho restantes de reproductoras (Tabla 32).

En la única cepa productora de BLEE encontrada en explotaciones de gallinas ponedoras, el perfil de resistencia constó de seis antibióticos: ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefotaxima, cefepime y trimetropin-sulfametoxazol. En pavos de engorde

también se encontró una única cepa con resistencia a la ampicilina, cefazolina, cefotaxima y cefepime.

**Tabla 31. Categorías de antimicrobianos utilizadas para definir MDR, XDR y PDR en enterobacterias.**  
Magiorakos *et al.*, 2011.

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) <sup>a</sup>
Aminoglycosides	Gentamicin		<i>Providencia rettgeri</i> ( <i>P. rettgeri</i> ), <i>Providencia stuartii</i> ( <i>P. stuartii</i> )
	Tobramycin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Amikacin		
	Netilmicin		<i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Anti-MRSA cephalosporins	Ceftaroline (approved only for <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> )		
Antipseudomonal penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Ticarcillin-clavulanic acid		<i>Escherichia hermannii</i> ( <i>E. hermannii</i> )
	Piperacillin-tazobactam		<i>E. hermannii</i>
Carbapenems	Ertapenem		
	Imipenem		
	Meropenem		
	Doripenem		

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) <sup>a</sup>
Non-extended spectrum cephalosporins; 1st and 2nd generation cephalosporins	Cefazolin		<i>Citrobacter freundii</i> (C. freundii), <i>Enterobacter aerogenes</i> (E. aerogenes), <i>Enterobacter cloacae</i> (E. cloacae), <i>Hafnia alvei</i> (H. alvei), <i>Morganella morganii</i> (M. morganii), <i>Proteus penneri</i> (P. penneri), <i>Proteus vulgaris</i> (P. vulgaris), <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>Serratia marcescens</i> (S. marcescens)
	Cefuroxime		<i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>S. marcescens</i>
Extended-spectrum cephalosporins; 3rd and 4th generation cephalosporins	Cefotaxime or ceftriaxone		
	Ceftazidime		
	Cefepime		
Cephameycins	Cefoxitin		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
	Cefotetan		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i>
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin		
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim-sulphamethoxazole		
Glycylcyclines	Tigecycline		<i>M. morganii</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (P. mirabilis), <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
Monobactams	Aztreonam		
Penicillins	Ampicillin		<i>Citrobacter koseri</i> (C. koseri), <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. hermannii</i> , <i>H. alvei</i> , <i>Klebsiellae spp.</i> , <i>M. morganii</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>

Antimicrobial category	Antimicrobial agent	Results of antimicrobial susceptibility testing (S or NS)	Species with intrinsic resistance to antimicrobial agents or categories (51) <sup>a</sup>
Penicillins + $\beta$ -lactamase inhibitors	Amoxicillin-clavulanic acid		<i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
	Ampicillin-sulbactam		<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>H. alvei</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>S. marcescens</i>
Phenicol	Chloramphenicol		
Phosphonic acids	Fosfomicin		
Polymyxins	Colistin		<i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. marcescens</i>
Tetracyclines	Tetracycline		<i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>
	Doxycycline		<b><i>M. morgani</i>, <i>P. penneri</i>, <i>P. vulgaris</i>, <i>P. rettgeri</i>, <i>P. stuartii</i></b>
	Minocycline		<i>M. morgani</i> , <i>P. penneri</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. stuartii</i>

Tabla 32. Patrones de resistencia de las cepas de *E. coli* aviaries fecales aisladas en este estudio.

Patrón	Nº cepas	%	B	P	R	Pa	Tipo de BLEE	Nº cepas	Colonias	AN	GM	AM	ATM	CFZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	AMC	CIP	LVX	SXT
1	1	1,2	0	0	1	0	CTX-M-1	1	417 G a	R		R		R		R		R				
2	3	3,6	3	0	0	0	SHV-12	3	209 G a 321 G b 334 G d			R	R	R		I	R					
3	1	1,2	1	0	0	0	SHV-12	1	191 G b			R	R	R			R			R	R	R
4	1	1,2	0	0	1	0	SHV-12	1	248 G a			R	R	R		I	R					R
5	8	9,5	5	0	3	0	SHV-12	8	109 G a 131 G b 212 G b 215 G b 334 G a 397 G b 450 G a 459 G a			R	R	R		R	R					
6	2	2,4	2	0	0	0	SHV-12	2	110 G c 458 G d			R	R	R		R	R	I		R	R	
7	5	5,9	3	0	2	0	SHV-12	5	240 G a 244 G a 322 G d 341 G c 373 G a			R	R	R		R	R			R	R	R
8	8	9,5	2	0	6	0	CTX-M-1	8	173 G a 212 G a 397 G a 425 G a 432 G a 84 G a 92 G a 92 G c			R	R	R		R		R				



Patrón	Nº cepas	%	B	P	R	Pa	Tipo de BLEE	Nº cepas	Colonias	AN	GM	AM	ATM	CFZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	AMC	CIP	LVX	SXT
9	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-32	1	57 G a			R	R	R		R	I	R		R	R	
10	2	2,4	2	0	0	0	CTX-M-1	1	106 G a			R	R	R		R		R	I	R	R	R
							CTX-M-14	1	97 G a			R	R	R		R		R		R	R	R
11	4	4,8	2	1	1	0	CTX-M-1	4	204 G a			R	R	R		R		R				R
									321 G a			R	R	R		R		R				R
									438 G a			R	R	R		R		R				R
									92 G b			R	R	R		R		R				R
12	1	1,2	1	0	0	0	SHV-12	1	289 G a			R	R	R	R	R	R		R	R	R	
13	1	1,2	1	0	0	0	SHV-12	1	271 G a			R	I	R			I					
14	6	7,1	3	0	3	0	CTX-M-1	4	180 G a			R	I	R		R		I				
									216 G a			R	I	R		R						
									216 G b			R		R		R		I				
									279 G a			R		R		R		I				
							CTX-M-9	2	252 G a		I	R		R		R						
									289 G b			R		R		R						
15	1	1,2	1	0	0	0	SHV-12	1	105 G c			R	I	R		R	R					
16	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-14	1	262 G a			R		R		R		I		R	I	
17	2	2,4	2	0	0	0	CTX-M-14	1	262 G b			R		R		R		I		R	R	
							CTX-M-1	1	341 G a			R		R		R		I		R	R	
18	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-9	1	262 G c			R		R		R		I		R	R	R
19	14	17	5	0	8	1	CTX-M14LIKE	1	101 G a			R		R		R		R				
							CTX-M-14	2	80 G a			R	I	R		R		R				
									131 G a			R		R		R		R				
							CTX-M-1	10	126 G a			R	I	R		R		R				
									187 G a			R		R		R		R				
									193 G a			R		R		R		R				
									290 G a			R		R		R		R				
									308 G b			R		R		R		R				
									358 P a			R		R		R		R				
									375 G a			R		R		R		R				
									412 G a			R	I	R		R		R				
									412 G b			R		R		R		R				
									62 G a			R		R		R		R				
							CTX-M-32	1	458 G a			R	I	R		R		R				

## Resultados y discusión

Patrón	Nº cepas	%	B	P	R	Pa	Tipo de BLEE	Nº cepas	Colonias	AN	GM	AM	ATM	CFZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	AMC	CIP	LVX	SXT
20	2	2,4	2	0	0	0	CTX-M-1	1	110 G a			R	I	R		R		R		R	R	
							CTX-M-14	1	458 G c			R	I	R		R		R		R	R	
21	5	6	5	0	0	0	CTX-M-14	5	105 G b			R		R		R		R		R	R	R
									110 G b			R	I	R		R		R		R	R	R
									322 G a			R	I	R		R		R	I	R	R	R
									458 G b			R	I	R		R		R		R	R	R
									58 G a			R	I	R		R		R	I	R	R	R
22	4	4,8	4	0	0	0	CTX-M-1	2	58 G c			R		R		R		R				R
									214 G a			R		R		R		R				R
							CTX-M-2*	1	263 G a			R	I	R		R		R				R
							CTX-M-14b	1	322 G c			R		R		R		R				R
23	2	2,4	1	0	1	0	CTX-M-1	1	164 G b			R		R		R		I				R
							CTX-M-14b	1	261 G b			R		R		R						R
24	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-14	1	191 G a			R	I	R	R	R	I	R	R			
25	1	1,2	0	0	1	0	SHV-2	1	424 G a			R		R		I			I			R
26	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-32	1	215 G a		R	R	R	R		R	R	R		R	R	
27	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-32	1	106 G b		R	R	R	R		R	R	R		R	R	R
28	2	2,4	2	0	0	0	CTX-M-32	2	192 G a		R	R	R	R		R	I	R				
									76 G a		R	R	R	R		R	I	R				
29	1	1,2	1	0	0	0	SHV-2	1	338 G a		R	R		R						R	R	
30	1	1,2	1	0	0	0	CTX-M-9	1	105 G a		R	R		R		R		R	I	R	R	R
Total	84		55	1	27	1		84		1	6	84	40	84	2	77	24	47	2	27	26	28
%		100	65	1	32	1				1,2	7,1	100,0	47,6	100,0	2,4	91,7	28,6	56,0	2,4	32,1	31,0	33,3
AN: Amikacina, GM: Getamicina, AM: Ampicilina, ATM: Aztreonam, CFZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, AMC: Amoxicilina/Clavulánico, CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina y SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol. Ninguna de las cepas fueron resistentes a IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, TZP: Piperacilina/Tazobactam y CL: Colistina.																						
B, P, R, Pa: Tipo de producción: broilers, ponedoras, reproductoras y pavos de engorde																						
R= Resistente I=Intermedio según las normas NCCLS/CLSI, 2014																						

#### 4.1.4 Serotipos

El serotipado de las 84 cepas fecales aviares de *E. coli* productoras de BLEE (CTX-M y SHV) mostró que pertenecían a 68 serotipos distintos (Tabla 33).

Los serotipos detectados en más de dos cepas aviares fecales fueron: **O101:H10** (tres cepas CTX-M-1; 3,5%) en dos manadas de reproductoras, **ONT:H4** (dos cepas CTX-M-1 y una cepa CTX-M-14b; 3,5%) en tres manadas de broilers, **ONT:H51** (dos cepas SHV-12 y una CTX-M-14; 3,5%) en dos manadas de broilers y **ONT:HNM** (una cepa CTX-M-1, otra CTX-M-32 y otra SHV-2; 3,5%) en dos manadas de broilers y una de reproductoras.

Los serotipos detectados en dos cepas aviares fecales fueron: **O106:HNM** (dos cepas SHV-12; 2,9%) en dos manadas de reproductoras, **O159:H21** (una cepa CTX-M-1 y otra CTX-M-14b; 2,9%) en dos manadas de broilers, **O20:H21** (una cepa SHV-12 y otra CTX-M-14; 2,9%) en dos manadas de broilers, **O44:H39** (una cepa CTX-M-1 y otra CTX-M-32; 2,9%) en la misma manada de broilers, **O60:H28** (dos cepas CTX-M-1; 2,9%) en una manada de broilers y otra de reproductoras, **O8:H4** (una cepa CTX-M-9 y otra SHV-12; 2,9%) en dos manadas de broilers, **O8:HNM** (una cepa CTX-M-1 y otra SHV-12; 2,9%) en una manada de broilers y otra de reproductoras y **O91:H7** (dos cepas CTX-M-1; 2,9%) en una manada de broilers y otra de reproductoras. El resto de serotipos se detectaron en una cepa.

También se encontró una gran diversidad de serotipos O:H entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo en la ciudad de Lugo (Herrera, 2015) y entre las cepas de *E. coli* BLEE bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA) (Mamani, 2014) (Tabla 34).

Tabla 33. Serotipos de las 84 cepas de *E. coli* productoras de BLEE.

SEROTIPO	Nº CEPAS	TIPO DE PRODUCCIÓN	TIPADO DE BLEE	Nº CEPAS
ONT:H4	3	Broilers	CTX-M-1	2
			CTX-M-14b	1
ONT:H51	3	Broilers	SHV-12	2
			CTX-M-14	1
ONT:HNM	3	Broilers	CTX-M-1	1
			CTX-M-32	1
		Reproductoras	SHV-2	1
O101:[H10]	3	Reproductoras	CTX-M-1	3
O159:H21	2	Broilers	CTX-M-14b	1
			CTX-M-1	1
O20:H21	2	Broilers	SHV-12	1
			CTX-M-14	1
O44:H39	2	Broilers	CTX-M-1	1
			CTX-M-32	1
O60:H28	2	Broilers	CTX-M-1	2
		Reproductoras		
O8:H4	2	Broilers	CTX-M-9	1
			SHV-12	1
O8:HNM	2	Broilers	SHV-12	1
		Reproductoras	CTX-M-1	1
O91:H7	2	Broilers	CTX-M-1	2
		Reproductoras		
O106:HNM	2	Reproductoras	SHV-12	2
O1:H42	1	Reproductoras	CTX-M-9	1
O101:HNM	1	Broilers	SHV-12	1
O109:H45	1	Broilers	SHV-12	1
O11:H12	1	Broilers	CTX-M-1	1
O116:HNM	1	Broilers	CTX-M-14	1
O120:H4	1	Reproductoras	CTX-M-1	1

SEROTIPO	Nº CEPAS	TIPO DE PRODUCCIÓN	TIPADO DE BLEE	Nº CEPAS
O125:H25	1	Broilers	SHV-12	1
O135:HNM	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O146:H4	1	Broilers	SHV-12	1
O147:HNM	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O153:H10	1	Broilers	CTX-M-32	1
O161:H15	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O161:H7	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O171:H4	1	Broilers	CTX-Mg9	1
O173:HNM	1	Reproductoras	SHV-12	1
O18:H21	1	Broilers	SHV-12	1
O2:H1	1	Ponedoras	CTX-M-1	1
O2:H11	1	Reproductoras	SHV-12	1
O2:H29	1	Broilers	SHV-12	1
O2:HNM	1	Reproductoras	CTX-M-14	1
O20:H14	1	Broilers	CTX-M-14	1
O21:H32	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O22:H19	1	Broilers	CTX-M-1	1
O25:H51	1	Broilers	CTX-M-1	1
O26:[H10]	1	Broilers	CTX-M-32	1
O27:H12	1	Broilers	SHV-12	1
O35:H27	1	Broilers	CTX-M-1	1
O45:H25	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O45:H9	1	Broilers	CTX-M-1	1
O45:HNM	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
O51:H10	1	Broilers	CTX-M-32	1
O51:H4	1	Broilers	CTX-M-14	1
O54:H21	1	Broilers	CTX-M-9	1
O55,19:HNM	1	Broilers	CTX-M-9	1
O60:H19	1	Broilers	CTX-M-14	1
O7:H15	1	Broilers	CTX-M-2	1
O7:H4	1	Broilers	CTX-M-14	1
O8:H11	1	Reproductoras	CTX-M-1	1

SEROTIPO	Nº CEPAS	TIPO DE PRODUCCIÓN	TIPADO DE BLEE	Nº CEPAS
O8:H19	1	Reproductoras	CTX-M-14	1
O8:H34	1	Broilers	CTX-M-32	1
O82:H21	1	Broilers	CTX-M-14	1
O85,132:H10	1	Broilers	SHV-2	1
O88:HNH	1	Broilers	SHV-12	1
O9:H10	1	Broilers	CTX-M-1	1
O9:H31	1	Broilers	CTX-M-14	1
O91:H28	1	Pavos de engorde	CTX-M-1	1
ONT:H10	1	Reproductoras	SHV-12	1
ONT:H11	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
ONT:H18	1	Broilers	CTX-M-14	1
ONT:H2	1	Broilers	SHV-12	1
ONT:H21	1	Reproductoras	SHV-12	1
ONT:H27	1	Broilers	SHV-12	1
ONT:H28	1	Broilers	CTX-M-1	1
ONT:H31	1	Reproductoras	CTX-M-1	1
ONT:H32	1	Broilers	SHV-12	1
ONT:H39	1	Broilers	SHV-12	1

**Tabla 34. Comparación de los serotipos de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aviares fecales con los de las cepas de carne de pollo (Herrera, 2015) y bacteriémicas humanas (Mamani, 2014).**

CEPAS HUMANAS BACTERIÉMICAS n= 96	CEPAS AVIARES FECALES N= 84	CEPAS DE CARNE DE POLLO n=127
O1:H- (1)	O1:H42 (1)	
O2:H5 (1), O2:H4 (1), O2:H- (2)	O2:H1 (1), O2:H11 (1), O2:H29 (1), O2:H- (1)	O2:H9 (1), O2:H40 (2), O2:H- (2)
		O3:H26 (3)
		O5:H10 (2), O5:H21 (1), O5:H32 (1)
		O6:H10 (1), O6:H16 (3), O6:HNT (3)
O7:H4 (2)	O7:H4 (1), O7:H15 (1)	O7:H4 (1)
O8:H4 (1), O8:H7 (2), O8:H6 (1), O8:H11 (1), O8:HNT (1)	O8:H4 (2), O8:H11 (1), O8:H19 (1), O8:H34 (1), O8:H- (2)	O8:H7 (1), O8:H19 (3), O8:H21 (1), O8:H- (1), O8:HNT (2)
O9:H4 (3)	O9:H10 (1), O9:H31(1)	O9:H51 (2), O9:H- (1)
O11:H9 (1)	O11:H12 (1)	O11:H51 (1)
		O14:H4 (1)
O15:H1 (4), O15:H- (1)		O15:H10 (2)
O16:H5 (1)		
	O18:H21 (1)	
O20:H9 (1), O20:H30 (1)	O20:H14 (1), O20:H21 (2)	O20:H4 (1), O20:H9 (1), O20:H10 (1), O20:H21 (1)
	O21:H32 (1)	O21:H16 (1), O21:HNT (1)
	O22:H19 (1)	
O23:H28 (1), O23:H- (1)		O23:H- (1)
O25:H4 (39), O25:H25 (1), O25:H- (1)	O25:H51 (1)	O25:H4 (7)
	O26:H10 (1)	O26:H- (1)
	O27:H12 (1)	
		O34:H- (1)
	O35:H27 (1)	
		O38:H39 (1)
		O40:H10 (1), O40:H48 (2)
	O44:H39 (2)	
	O45:H9 (1), O45:H25 (1), O45:H- (1)	O45:H3 (1), O45:H8 (1), O45:H9 (1), O45:H- (1)
	O51:H4 (1), O51:H10 (1)	O51:H4 (1), O51:H17 (1)
		O53:H18 (1)
O54:H21(1)	O54:H21(1)	

CEPAS HUMANAS BACTERIÉMICAS n= 96	CEPAS AVIARES FECALES N= 84	CEPAS DE CARNE DE POLLO n=127
	O55,19:H- (1)	O55:H14 (1)
	O60:H19 (1), O60:H28 (2)	
		O63:HNT (1)
O68:H21 (1)		O68:HNT (1)
O77:H18 (1)		
		O78:H4 (1)
	O82:H21(1)	O82:H21 (2)
	O85,132:H10 (1)	O85:H10 (1)
		O86:HNT (1)
	O88:H- (1)	O88:H- (1)
O91:H28 (1)	O91:H7 (2), O91:H28 (1)	O91:H4 (1)
		O100:H- (1)
O101:H10 (2)	O101:H10 (3), O101:H- (1)	
O102:H6 (1)		
		O103:H- (1)
O105:H21 (1)		
	O106:H- (2)	
	O109:H45 (1)	
		O111:H4 (1)
		O115:H2 (1), O115:H25 (1), O115:HNT (1)
	O116:H- (1)	O116:H26 (1), O116:HNT (1)
		O119:H27 (1), O119:H- (1)
	O120:H4 (1)	O120:H4 (1)
		O123:H34 (1)
		O124:H- (1)
	O125:H25 (1)	
		O128:H2 (1)
O130:H6 (1)		O130:H30 (1)
		O131:H27 (1)
		O132:HNM (1)
	O135:H- (1)	O135:H21 (1)
		O140:H27 (1)
O144:H- (1)		
		O145:H4 (1), O145:H40 (1), O145:H- (1)
	O146:H4 (1)	O146:H4 (1)
	O147:H- (1)	



CEPAS HUMANAS BACTERIÉMICAS n= 96	CEPAS AVIARES FECALES N= 84	CEPAS DE CARNE DE POLLO n=127
O153:H15 (1), O153:H19 (1), O153:H34 (2)	O153:H10 (1)	O153:H10 (7), O153:H34 (1), O153:H- (2)
		O157:H- (1)
	O159:H21 (2)	O159:H4 (1)
	O161:H7 (1), O161:H15 (1)	
	O171:H4 (1)	
	O173:H- (1)	O173:H16 (1), O173:HNT (1)
		O177:H32 (2)
ONT:H4 (1), ONT:H5 (1), ONT:H6 (1), ONT:H10 (1), ONT:H16 (1), ONT:H18 (1), ONT:H25 (2), ONT:H34 (1) ONT:H51 (2), ONT:H- (3)	ONT:H2 (1), ONT:H4 (3), ONT:H10 (1), ONT:H11 (1), ONT:H18 (1), ONT:H21 (1), ONT:H27 (1), ONT:H28 (1), ONT:H31(1), ONT:H32 (1), ONT:H39 (1), ONT:H51 (3), ONT:H- (3)	ONT:H1 (1), ONT:H4 (1), ONT:H12 (1), ONT:H25 (1), ONT:H26 (2), ONT:H27 (1), ONT:H28 (1), ONT:H40 (1), ONT:H49 (1), ONT:H- (6)

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias de cepas humanas bacteriémicas con cepas *E. coli* BLEE aviars fecales de esta tesis y en verde se resaltan las coincidencias de las cepas de este estudio con las cepas de carne de pollo.

#### 4.1.5 *Genes de virulencia*

Las 84 cepas aviars fecales de *E. coli* productoras de BLEE fueron caracterizadas mediante PCR para la presencia de 35 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos y aves.

Los genes más prevalentes fueron *fimH* (96,4%), *traT* (73,8%), *hlyF* (63,1%), *iroN* (59,5%), *iss* (59,5%) y *ompT* (52,4%) (Tabla 35).

En contraste, en ninguna de las cepas fueron identificados los genes *pap* AH, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *yfcV*, *cdtB*, *hlyA*, *kpsM* II-K2 y *kpsM* III.

Tabla 35. Prevalencia de los distintos genes de virulencia según el tipo de producción en la explotación.

B:Broilers, P:Gallinas ponedoras, R:Gallinas reproductoras, Pa:Pavos de engorde.

GENES	Nº Y ORIGEN DE LAS CEPAS				
	B %	P %	R %	Pa %	Total %
<b>Adhesinas</b>					
<i>fimH</i>	52 94,5	1 100,0	27 100,0	1 100,0	81 96,4
<i>fimA</i> <sub>MT78</sub>	10 18,2	1 100,0	3 11,1	0 0,0	15 17,9
<i>papC</i>	9 16,4	0 0,0	0 0,0	1 100,0	10 11,9
<i>papEF</i>	9 16,4	0 0,0	0 0,0	1 100,0	10 11,9
<i>papGII</i>	9 16,4	0 0,0	0 0,0	1 100,0	10 11,9
<b>Toxinas</b>					
<i>cnf1</i>	1 1,8	0 0,0	0 0,0	0 0,0	1 1,2
<i>sat</i>	2 3,6	0 0,0	0 0,0	0 0,0	2 2,4
<i>tsh</i>	13 23,6	0 0,0	3 11,1	1 100,0	17 20,2
<i>hlyF</i>	34 61,8	1 100,0	17 63,0	1 100,0	53 63,1
<i>vat</i>	4 7,3	1 100,0	2 7,4	0 0,0	7 8,3
<b>Sideróforos</b>					
<i>iucD</i>	25 45,5	0 0,0	10 37,0	1 100,0	36 42,9
<i>iutA</i>	25 45,5	0 0,0	10 37,0	1 100,0	36 42,9
<i>iroN</i>	30 54,5	1 100,0	18 66,7	1 100,0	50 59,5
<i>fyuA</i>	10 18,2	1 100,0	5 18,5	0 0,0	16 19,0
<i>chuA</i>	13 23,6	1 100,0	6 22,2	0 0,0	20 23,8
<b>Cápsula</b>					
<i>KpsM</i> II-K5	4 7,3	1 100,0	2 7,4	0 0,0	7 8,3
<i>KpsM</i> II-K1	0 0,0	0 0,0	1 3,7	0 0,0	1 1,2
<b>Varios</b>					
<i>cvaC</i>	18 32,7	0 0,0	11 40,7	1 100,0	30 35,7
<i>iss</i>	31 56,4	1 100,0	17 63,0	1 100,0	50 59,5
<i>traT</i>	38 69,1	1 100,0	22 81,5	1 100,0	62 73,8
<i>ibeA</i>	0 0,0	1 100,0	2 7,4	0 0,0	3 3,6
<i>malX</i>	11 20,0	1 100,0	3 11,1	0 0,0	16 19,0
<i>usp</i>	1 1,8	1 100,0	2 7,4	0 0,0	4 4,8
<i>ompT</i>	24 43,6	1 100,0	19 70,4	0 0,0	44 52,4

Se han observado un total de 60 perfiles de virulencia (Tabla 22), de ellos, los seis más prevalentes fueron compartidos por broilers y reproductoras:

*-fimH*

*-fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT*

*-fimH hlyF iroN iss traT*

*-fimH hlyF iroN iss traT ompT*

*-fimH traT ompT*

*-fimH chuA traT ompT*

Tanto el perfil de virulencia obtenido en ponedoras (*fimH fimAvMT78 yfcV hlyF vat iroN fyuA chuA kpsM II-K5 iss traT ibeA malX usp ompT*) como el de pavos de engorde (*fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT*) no se encontraron ni en broilers ni en reproductoras.

Las 84 cepas productoras de BLEE presentaron una media de 6,9 genes de virulencia, con un rango que varió entre 0 y 19 genes. En concreto, las cepas con mayor número de genes de virulencia pertenecieron a los serotipos O2:HNM (una cepa CTX-M-14 con diecinueve genes de virulencia) , O120:H4 (una cepa CTX-M-1 con dieciocho genes de virulencia) ambos aislados eran de explotaciones de gallinas reproductoras de multiplicación carne y O54:H21 (una cepa CTX-M-9 con dieciséis genes de virulencia) de una explotación de broilers. En contraste se encontró una única cepa que no presentó ningún gen de virulencia.

Al comparar los serotipos con mayor número de genes de virulencia de este estudio y los encontrados en carne de ave en el estudio de Herrera (2015), vemos que son los

misimos: O2:HNH y O120:H4. En nuestro estudio los encontramos en granjas de reproductoras, lo que sería interesante estudiar una posible transmisión vertical desde las granjas de madres reproductoras hasta la obtención de carne de broilers. Dierikx *et al.*, 2013 observó que era posible una transmisión vertical a través de huevos contaminados en la cadena de la producción avícola. En la cima de la pirámide de este tipo de producción había una menor prevalencia de cepas *E. coli* productoras de BLEE con respecto a la base de la pirámide, lo que lo convierte en un sistema complejo y vulnerable.

El estatus ExPEC de todas las 84 cepas aviarias fecales de *E. coli* productoras de BLEE fue analizado según la definición de Johnson *et al.* (2003a), según la cual, una cepa era considerada ExPEC si portaba dos o más de los siguientes genes: *papA* y/o *papC*, *sfa/focDE*, *afa/draBC*, *iutA* y *KpsM* II. Así, 11 cepas (13,1%) de las 84 productoras de BLEE fueron consideradas ExPEC, de las cuales el 63,6% corresponden a broilers, el 27,3% a reproductoras y el 9,1% a pavos de engorde.

El porcentaje de cepas con el estatus ExPEC encontrado entre las cepas aviarias fecales de esta tesis (13,1%) es similar al encontrado entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de carne de pollo (16,5%) en la ciudad de Lugo (Herrera, 2015) y muy inferior al encontrado entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE bacteriémicas humanas (65,6%) ( $p < 0,001$ ) del Hospital Universitario Lucus Augusti (Tabla 36).

Spurbeck *et al.*, 2012 definieron las cepas UPEC como aquellas que poseían al menos tres de los siguientes cuatro genes: *chuA*, *fyuA*, *vat* e *yfcV*. Basándonos en este criterio únicamente el 9.5% de las 84 cepas aviarias fecales de *E. coli* productoras de BLEE serían UPEC, porcentaje que es muy inferior al encontrado

(44,8%) entre las cepas bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucas Augusti ( $p<0,001$ ).

Por su parte Johnson TJ *et al.* (2008b) definieron como cepas APEC aquellas que presentasen al menos cuatro de los siguientes cinco genes de virulencia: *iroN*, *ompT*, *hlyF*, *iss* e *iutA*. Siguiendo este criterio el 47,6% de las cepas aviaries fecales de *E. coli* productoras de BLEE presentaron el estatus APEC frente a tan solo el 19,8% de las cepas bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucas Augusti ( $p<0,001$ ).

En la tabla 36 se puede apreciar claramente que mientras las cepas aviaries fecales y las de carne de pollo presentan prevalencias similares con respecto a la mayoría de los genes de virulencia, las cepas bacteriémicas humanas presentan prevalencias muy diferentes con respecto a numerosos genes de virulencia.

Tabla 36. Comparación de la prevalencia de genes de virulencia de las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aviares fecales con los de las cepas de carne de pollo (Herrera, 2015) y bacteriémicas humanas (Mamani, 2014 y datos no publicados del LREC-USC).

GENES DE VIRULENCIA	<i>E. coli</i> BLEE Bacteriémicas humanas n=96		<i>E. coli</i> BLEE Aviares fecales n=84		<i>E. coli</i> BLEE Aviares carne n=127		Valor de p Humanas vs Aviares fecales	Valor de p Aviares carne vs Aviares fecales
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
Adhesinas								
<i>fimH</i>	94	97,9	81	96,4	124	97,6		
<i>fimAv</i> <sub>MT78</sub>	10	10,4	15	17,9	<b>38</b>	<b>29,9</b>		0,03
<i>papAH</i>	<b>21</b>	<b>21,9</b>	0	0	NR		<0,001	
<i>papC</i>	21	21,9	10	11,9	NR			
<i>papEF</i>	<b>22</b>	<b>22,9</b>	10	11,9	11	8,7	0,04	
<i>papG</i> I	0		0		NR			
<i>papG</i> II	16	16,7	10	11,9	NR			
<i>papG</i> III	2	2,1	0		NR			
<i>sfa/focDE</i>	1	1	0		0			
<i>afa/draBC</i>	<b>27</b>	<b>28,1</b>	0		0		<0,001	
<i>afaFM955459</i>	<b>26</b>	<b>27,1</b>	0		0		<0,001	
<i>yfcV</i>	<b>49</b>	<b>51,0</b>	0		NR		<0,001	
Toxinas								
<i>cnf1</i>	4	4,2	1	1,2	0			
<i>cdtB</i>	1	1,0	0		1	0,8		
<i>sat</i>	<b>45</b>	<b>46,9</b>	2	2,4	3	2,4	<0,001	
<i>tsh</i>	10	10,4	17	20,2	32	25,2		
<i>hlyA</i>	<b>5</b>	<b>5,2</b>	0		0		0,04	
<i>hlyF</i>	25	26,0	<b>53</b>	<b>63,1</b>	NR		<0,001	
<i>vat</i>	6	6,3	7	8,3	NR			

GENES DE VIRULENCIA	<i>E. coli</i> BLEE Bacteriémicas humanas n=96		<i>E. coli</i> BLEE Aviares fecales n=84		<i>E. coli</i> BLEE Aviares carne n=127		Valor de p Humanas vs Aviares fecales	Valor de p Aviares carne vs Aviares fecales
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
Sideróforos								
<i>iucD</i>	81	84.4	36	42,9	70	55,1	<0,001	
<i>iutA</i>	81	84,4	36	42,9	70	55,1	<0,001	
<i>iroN</i>	21	21,9	50	59,5	55	43,3	<0,001	0,01
<i>fyuA</i>	65	67,7	16	19,0	NR		<0,001	
<i>chuA</i>	62	64,6	20	23,8	35	27,6	<0,001	
Cápsula								
<i>kii-kpsM II</i>	60	62,5	8	9,5	18	14,2	<0,001	
<i>kpsM II-K2</i>	27	28,1	0		2	1,6	<0,001	
<i>kpsM II-K5</i>	29	30,2	7	8,3	7	5,5	<0,001	
<i>neuC-K1</i>	4	4,2	1	1,2	9	7,1		
<i>kpsM III</i>	3	3,1	0		5	3,9		
Varios								
<i>cvaC</i>	17	17,7	30	35,7	30	23,6	0,004	0,04
<i>iss</i>	19	19,8	50	59,5	56	44,1	<0,001	0,01
<i>traT</i>	56	58,3	62	73,8	36	28,3	0,02	<0,001
<i>ibeA</i>	9	9,4	3	3,6	9	7,1		
<i>malX (PAI)</i>	55	57,3	16	19,0	23	18,1	<0,001	
<i>usp</i>	48	50,0	4	4,8	11	8,7	<0,001	
<i>ompT</i>	70	72,9	44	52,4	NR		0,003	
ExPEC	63	65,6	11	13,1	21	16,5	<0,001	
UPEC	43	44,8	8	9,5	NR		<0,001	
APEC	19	19,8	40	47,6	NR		<0,001	

#### 4.1.6 Grupos filogenéticos

Cuando analizamos el sistema de cuatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) observamos que los más prevalentes entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aviares fecales fueron el A (42,8%) y el B1 (33,3%) al igual que en las cepas BLEE aisladas de carne de pollo en la ciudad de Lugo (Herrera, 2015). En contraste, entre las cepas BLEE causantes de bacteriemias en pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti el grupo más prevalente resultó ser el B2 (45,8%) que sin embargo en las cepas fecales aviares (4,8%) y de carne de pollo (7,1%) supuso un bajo porcentaje en ambos casos. Evidentemente las diferencias resultaron significativas entre las cepas aviares fecales y las bacteriémicas humanas, mientras que entre las de aves fecales y de carne de pollo no lo fueron (Tabla 37).

**Tabla 37.** Comparación de los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D (Clermont *et al.*, 2000) entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE fecales aviares de esta tesis con las causantes de bacteriemias en pacientes humanos (Mamani, 2014) y con las cepas aisladas de carne de pollo (Herrera, 2015).

GRUPO FILOGENÉTICO	<i>E. coli</i> BLEE Bacteriémicas humanas n=96		<i>E. coli</i> BLEE Aviares fecales n=84		<i>E. coli</i> BLEE Aviares carne n=127		Valor de p Humanas vs Aviares fecales	Valor de p Aviares fecales vs Aviares carne
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
<b>A</b>	16	16,7	<b>36</b>	<b>42,8</b>	<b>56</b>	<b>44,1</b>	<0,001	0,004
<b>B1</b>	18	18,8	<b>28</b>	<b>33,3</b>	<b>36</b>	<b>28,3</b>	0,02	
<b>B2</b>	<b>44</b>	<b>45,8</b>	4	4,8	9	7,1	<0,001	0,02
<b>C</b>	18	18,8	16	19,1	26	20,5		



Cuando realizamos el análisis con el nuevo sistema ampliado de siete grupos filogenéticos de Clermont *et al.* (2013) también observamos que los grupos filogenéticos A y B1 fueron los más prevalentes entre las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE de esta tesis. No observándose diferencias significativas entre las cepas aisladas de broilers y de reproductoras (Tabla 38). En contraste, si que se observan diferencias, pero únicamente con respecto a los grupos filogenéticos A, B1 y B2, entre las cepas fecales aviares y las bacteriémicas humanas (Tabla 39).

**Tabla 38. Distribución de los grupos filogenéticos según el tipo de producción.**

GRUPO FILOGENÉTICO	BROILERS		PONEDORAS		REPRODUCTORAS		PAVOS DE ENGORDE		Total	%
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%		
<b>A</b>	20	36,4	0	0,0	13	48,1	0	0,0	33	39,3
<b>B1</b>	19	34,5	0	0,0	8	29,6	1	100,0	28	33,3
<b>B2</b>	0	0,0	1	100,0	2	7,4	0	0,0	3	3,6
<b>C</b>	3	5,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	3,6
<b>D</b>	0	0,0	0	0,0	1	3,7	0	0,0	1	1,2
<b>E</b>	6	10,9	0	0,0	2	7,4	0	0,0	8	9,5
<b>F</b>	7	12,7	0	0,0	1	3,7	0	0,0	8	9,5
<b>Total</b>	55	100,0	1	100,0	27	100,0	1	100,0	84	100,0

**Tabla 39. Comparación de los grupos filogenéticos de las cepas *E. coli* BLEE fecales aviares de esta tesis con los de las cepas causantes de bacteriémias en pacientes humanos. Los datos correspondientes al sistema de Clermont *et al.* (2013) son del LREC-USC y no han sido publicados.**

GRUPO FILOGENÉTICO	<i>E. coli</i> BLEE Bacteriémicas humanas n=96		<i>E. coli</i> BLEE Aviares fecales n=84		Valor de p Humanas vs Aviares fecales
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	
<b>A</b>	11	11,5	<b>33</b>	<b>39,3</b>	<0,001
<b>B1</b>	18	18,8	<b>28</b>	<b>33,3</b>	0.01
<b>B2</b>	<b>44</b>	<b>45,8</b>	3	3,6	<0,001
<b>C</b>	5	5,2	3	3,6	
<b>D</b>	1	1,0	1	1,0	
<b>E</b>	11	11,5	8	9,5	
<b>F</b>	6	6,3	8	9,5	

Tabla 40. Cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE de los grupos filogenéticos A y C.

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
FV19215-57Ga	A/A	CH7-23	NR	O8:H34	CTX-M-32	<i>fimH</i>	1		NO
FV19273-279Ga	A/A	CH11-23	NR	O21:H32	CTX-M-1	<i>fimH traT ompT</i>	3		NO
FV19283-321Gb	A/A	CH11-23	NR	ONT:H32	SHV-12	<i>fimH</i>	1		NO
FV19294-375Ga	A/A	CH11-23	ST1684	O101:[H10]	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	9	APEC	NO
FV19298-412Ga	A/A	CH11-23	ST1684	O101:[H10]	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	9	APEC	NO
FV19300-417Ga	A/A	CH11-23	ST1684	O101:[H10]	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	9	APEC	NO
FV19299-412Gb	A/A	CH94-23	NR	O45:HNM	CTX-M-1	<i>fimH</i>	1		NO
FV19242-164Gb	A/A	CH11-24	ST608	O147:HNM	CTX-M-1	<i>fimH hlyFiroN iss traT ompT</i>	6	APEC	NO
FV19246-191Ga	A/A	CH282-24	ST1818	O116:HNM	CTX-M-14	<i>fimH tsh</i>	2		NO
FV19272-271Ga	A/A	CH7-25	NR	O8:HNM	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	5		NO
FV19305-438Ga	A/A	CH7-25	NR	O8:HNM	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	5		NO
FV19251-209Ga	A/A	CH11-27	NR	ONT:H39	SHV-12	<i>fimH papC</i>	2		NO
FV19259-240Ga	A/A	CH27-30	NR	O106:HNM	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	6	APEC	NO
FV19293-373Ga	A/A	CH27-30	NR	O106:HNM	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	6	APEC	NO

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
FV19266-262Ga	A/A	CH11-31	ST93 (cc168)	O7:H4	CTX-M-14	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC iss traT ompT</i>	14	ExPEC APEC	SI
FV19258-216Gb	A/A	CH11-NEG	ST93 (cc168)	O11:H12	CTX-M-1	<i>pacC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA kpsM II-K5 cvaC iss traT</i>	13	ExPEC APEC	SI
FV19237-110Gc	A/A	CH153-39	NR	O88:HNM	SHV-12	<i>fimH traT ompT</i>	3		NO
FV19289-338Ga	A/A	CH27-41	NR	O85,132:H10	SHV-2	<i>fimH fyuA traT</i>	3		NO
FV19303-425Ga	A/A	CH7-54	ST- NUEVO	ONT:H11	CTX-M-1	<i>fimH</i>	1		SI
FV19231-105Gc	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O27:H12	SHV-12	<i>fimH fimAvMT78</i>	2		SI
FV19247-191Gb	A/A	CH11-54	ST744 (cc10)	O101:HNM	SHV-12	<i>fimH fimAvMT78 hlyF traT</i>	4		SI
FV19248-192Ga	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O153:H10	CTX-M-32	<i>fimH fimAvMT78 fyuA traT</i>	4		SI
FV19277-290Ga	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O135:HNM	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iroN iss traT</i>	6		SI
FV19304-432Ga	A/A	CH11-54	ST48 (cc10)	O8:H11	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iroN traT</i>	5		SI
FV19311-459Ga	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	ONT:H2	SHV-12	<i>fimH fimAvMT78</i>	2		SI
FV19227-101Ga	A/A	CH11-93	ST10 (cc10)	O171:H4	CTX-M14LIKE	<i>fimH fimAvMT78 papC papEF papGII fyuA</i>	6		NO
FV19308-458Gb	A/A	CH11-167	NR	ONT:H18	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA cvaC iss traT</i>	7		NO
FV19220-76Ga	A/A	CH4-305	NR	O51:H10	CTX-M-32	<i>fimH</i>	1		NO
FV19302-424Ga	A/A	CH11-400	ST48 (cc10)	ONT:HNM	SHV-2	<i>fimH cvaC traT ompT</i>	4		SI

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
<b>FV19282-321Ga</b>	A/A	CH11-NT	ST3525	ONT:H4	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	7	APEC	NO
<b>FV19288-334Gd</b>	A/A	CH11-NT	ST542	O109:H45	SHV-12	<i>fimH fimAvMT78 hlyF iucD iutA iroN iss</i>	7	APEC	NO
<b>FV19238-126Ga</b>	A/A	CH65-NT	NR	O9:H10	CTX-M-1	<i>fimH papC iroN usp</i>	4		NO
<b>FV19235-110Ga</b>	A/A	CH174-NEG	NR	ONT:HNM	CTX-M-1	<i>ompT</i>	1		NO
<b>FV19260-244Ga</b>	A/C	CH4-24	ST410 (cc23)	ONT:H51	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	4		SI
<b>FV19310-458Gd</b>	A/C	CH4-24	ST410 (cc23)	ONT:H51	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	5		SI
<b>FV19217-58Gc</b>	A/C	CH4-39	ST88 (cc23)	O45:H9	CTX-M-1	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA cvaC iss traT ompT</i>	11	APEC	SI

**Tabla 41. Cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
19223-92 G a	B1/B1	CH6-25	NR	O159:H21	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 traT ompT</i>	4		NO
19285-322 G c	B1/B1	CH6-25	NR	O159:H21	CTX-M-14b	<i>fimH fimAvMT78 traT ompT</i>	4		NO
19236-110 G b	B1/B1	CH4-31	ST533	O9:H31	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iss traT malX ompT</i>	8	APEC	SI
19261-248 G a	B1/B1	CH4-31	ST345	O2:H11	SHV-12	<i>fimH iucD iroN cvaC iss ompT</i>	6		SI
19284-322 G a	B1/B1	CH4-31	ST533	O20:H14	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	10	APEC	SI
19222-84 G a	B1/B1	CH95-31	ST351	O161:H7	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss ompT</i>	8	APEC	NO
19216-58 G a	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	O51:H4	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	4		SI
19240-131 G b	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	ONT:H21	SHV-12	<i>fimH</i>	1		SI
19309-458 G c	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	ONT:H51	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss</i>	5		SI
19218-62 G a	B1/B1	CH65-32	ST162 (cc469)	O60:H28	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	7	APEC	NO
19221-80 G a	B1/B1	CH65-32	ST162 (cc469)	O8:H19	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	8	APEC	NO
19230-105 G b	B1/B1	CH65-32	NR	O60:H19	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iss traT ompT</i>	7	APEC	NO
19249-193 G a	B1/B1	CH65-32	NR	O60:H28	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT ompT</i>	7	APEC	NO
19290-341 G a	B1/B1	CH65-32	ST1431	O22:H19	CTX-M-1	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	9	APEC	NO
19245-187 G a	B1/B1	CH95-32	ST1304	O91:H7	CTX-M-1	<i>fimH sat hlyF iroN cvaC iss traT malX</i>	9	APEC	NO

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
						<i>ompT</i>			
19296-397 G a	B1/B1	CH95-32	NR	O91:H7	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	8	APEC	NO
19224-92 G b	B1/B1	CH29-33	ST- NUEVO	ONT:H28	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iroN iss traT ompT</i>	6	APEC	NO
19226-97 G a	B1/B1	CH41-35	ST359	O20:H21	CTX-M-14	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	8	APEC	SI
19274-289 G a	B1/B1	CH41-35	ST359	O20:H21	SHV-12	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	8	APEC	SI
19292-358 P a	B1/B1	CH19-38	ST- NUEVO	O91:H28	CTX-M-1	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	12	ExPEC APEC	NO
19229-105 G a	B1/B1	CH29-38	ST156 (cc156)	O55,19:HNM	CTX-M-9	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN traT</i>	6		SI
19225-92 G c	B1/B1	CH4-41	NR	O25:H51	CTX-M-1	<i>fimH</i>	1		NO
19287-334 G a	B1/B1	CH19-86	ST602 (cc446)	O18:H21	SHV-12	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	9	APEC	SI
19297-397 G b	B1/B1	CH95-121	NR	O173:HNM	SHV-12	<i>fimH traT ompT</i>	3		NO
19291-341 G c	B1/B1	CH65-276	ST297	ONT:H27	SHV-12	<i>fimH fimAvMT78 tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	12	APEC	NO
19253-212 G b	B1/B1	CH6-289	ST1389	ONT:H10	SHV-12	<i>fimH fyuA traT ompT</i>	4		SI
19267-262 G b	B1/B1	CH19-NT	ST1800	O82:H21	CTX-M-14	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT ompT</i>	10	APEC	NO
19256-215 G b	B1/B1	CH11-NEG	NR	O2:H29	SHV-12	NINGUNO	0		NO

**Tabla 42. Cepas aviarias fecales de *E. coli* productoras de BLEE de los grupos filogenéticos D, E y F.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
19252-212 G a	D/D	CH36-93	NR	O161:H15	CTX-M-1	<i>fimH chuA traT ompT</i>	4		NO
19281-308 G b	B2/E	CH224-NT	NR	ONT:H31	CTX-M-1	<i>fimH chuA traT</i>	3		NO
19269-263 G a	D/E	CH26-3	ST38 (cc38)	O7:H15	CTX-M-2*	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT</i>	10	APEC	NO
19244-180 G a	D/E	CH31-27	ST57 (cc350)	O45:H25	CTX-M-1	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA iss traT ompT</i>	11	APEC	NO
19286-322 G d	D/E	CH31-27	NR	O125:H25	SHV-12	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN chuA iss traT</i>	9	APEC	NO
19254-214 G a	D/E	CH31-54	ST350 (cc350)	O35:H27	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 papEF papGII cnf1 hlyF iucD iutA iroN chuA iss traT ompT</i>	13	ExPEC APEC	NO
19255-215 G a	D/E	CH276-108	NR	O26:[H10]	CTX-M-32	<i>fimH papC papEF papGII chuA traT</i>	6		NO
19232-106 G a	D/E	CH23-121	NR	O44:H39	CTX-M-1	<i>fimH chuA traT ompT</i>	4		NO
19233-106 G b	D/E	CH23-121	NR	O44:H39	CTX-M-32	<i>fimH chuA ompT</i>	3		NO
19257-216 G a	D/F	CH4-58	ST648 (cc648)	ONT:H4	CTX-M-1	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	14	EXPEC UPEC	SI
19263-252 G a	D/F	CH4-58	ST648 (cc648)	O1:H42	CTX-M-9	<i>fimH yfcV tshhlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT malX ompT</i>	15	EXPEC UPEC APEC	SI
19307-458 G a	D/F	CH4-58	ST648 (cc648)	ONT:HNM	CTX-M-32	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	14	EXPEC UPEC	SI

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
<b>19234-109 G a</b>	D/F	CH45-97	NR	O146:H4	SHV-12	<i>fimH iucD iroN fyuA chuA cvaC iss traT malX ompT</i>	10		NO
<b>19265-261 G b</b>	D/F	CH45-97	ST117	ONT:H4	CTX-M-14b	<i>fimH papC papEF papGII hlyF vat iucD iutA fyuA chuA iroN cvaC iss traT malX</i>	15	EXPEC UPEC APEC	NO
<b>19268-262 G c</b>	D/F	CH45-97	ST117	O54:H21	CTX-M-9	<i>fimH papC papEF papGII sat hlyF vat iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT malX ompT</i>	16	ExPEC APEC	NO
<b>19275-289 G b</b>	D/F	CH45-97	NR	O8:H4	CTX-M-9	<i>fimH tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA iss traT malX ompT</i>	13	UPEC APEC	NO
<b>19306-450 G a</b>	D/F	CH486-97	ST3778	O8:H4	SHV-12	<i>fimH hlyF vat iucD iutA iroN chuA cvaC iss traT malX ompT</i>	12	APEC	NO



**Tabla 43. Cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B2.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS	BLEE HUMANOS (Mamani, 2014)
<b>19239-131 G a</b>	B2/B2	CH39-2	ST135	O2:HNM	CTX-M-14	<i>fimH fimAvMT78 yfcV tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	19	EXPEC UPEC APEC	NO
<b>19250-204 G a</b>	B2/B2	CH39-2	NR	O2:H1	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 yfcV hlyF vat iroN fyuA chuA kpsM II-K5 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	15	APEC UPEC	NO
<b>19243-173 G a</b>	B2/B2	CH40-22	ST428	O120:H4	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 yfcV tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	18	EXPEC UPEC NMEC APEC	SI

#### 4.1.7 *Clonotipos y secuencias tipo*

Se realizó el clonotipado de las 84 cepas aviaries fecales de *E. coli* productoras de BLEE donde se observaron un total de 51 clonotipos (Tabla 44).

Los siete clonotipos más prevalentes fueron:

- **CH11-54:** seis cepas del filogrupo A y del complejo clonal CC10 y cuatro con la ST10.
- **CH11-23:** cinco cepas del filogrupo A y tres de ellas con serotipo O101:H10 y la ST1684.
- **CH65-32:** cinco cepas del filogrupo B1, tres de ellas con el antígeno H19, dos con el serotipo O60:H28 y dos con la ST162.
- **CH45-97:** cuatro cepas con filogrupo F, tres de ellas con el antígeno H4 y dos con la ST117.
- **CH4-31:** tres cepas del filogrupo B1 y dos de la ST533.
- **CH4-32:** tres cepas del filogrupo B1 y de la ST155.
- **CH4-58:** tres cepas del filogrupo F y de la ST648.

Dos de los clonotipos más prevalentes en carne de broiler (Herrera, 2015) también fueron CH11-54 y CH45-97. En nuestro estudio el clonotipo CH11-54 aparece en cuatro manadas de broilers y dos de reproductoras y el clonotipo CH45-97 aparece sólo en manadas de broilers.

**Tabla 44. Relación de clonotipos de las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE.**

CLONOTIPO	Nº CEPAS	TIPO DE PRODUCCIÓN	Nº CEPAS
<b>CH11-54**</b>	6	Broilers	4
		Reproductoras	2
<b>CH11-23*</b>	5	Reproductoras	4
		Broilers	1
<b>CH65-32*</b>	5	Broilers	3
		Reproductoras	2
<b>CH45-97*</b>	4	Broilers	4
<b>CH11-NT o CH11-NEG</b>	4	Broilers	4
<b>CH4-31**</b>	3	Reproductoras	1
		Broilers	2
<b>CH4-32**</b>	3	Reproductoras	1
		Broilers	2
<b>CH4-58**</b>	3	Broilers	2
		Reproductoras	1
CH23-121	2	Broilers	2
CH27-30	2	Reproductoras	2
CH31-27*	2	Broilers	1
		Reproductoras	1
CH41-35**	2	Broilers	2
CH4-24**	2	Broilers	2
CH6-25	2	Broilers	2
CH7-25*	2	Reproductoras	1
		Broilers	1
CH95-32	2	Reproductoras	1
		Broilers	1
CH39-2*	2	Ponedoras	1
		Reproductoras	1
CH11-27*	1	Broilers	1
CH36-93	1	Reproductoras	1
CH11-167*	1	Broilers	1
CH11-24*	1	Reproductoras	1
CH11-31*	1	Broilers	1

CLONOTIPO	Nº CEPAS	TIPO DE PRODUCCIÓN	Nº CEPAS
CH11-400*	1	Reproductoras	1
CH11-93	1	Broilers	1
CH153-39*	1	Broilers	1
CH19-38	1	Pavos de engorde	1
CH19-86*	1	Broilers	1
CH26-3	1	Broilers	1
CH27-41*	1	Broilers	1
CH276-108*	1	Broilers	1
CH282-24	1	Broilers	1
CH29-33	1	Broilers	1
CH29-38**	1	Broilers	1
CH31-54*	1	Broilers	1
CH40-22**	1	Reproductoras	1
CH4-305	1	Broilers	1
CH4-39*	1	Broilers	1
CH4-41	1	Broilers	1
CH486-97	1	Broilers	1
CH6-289*	1	Reproductoras	1
CH65-276*	1	Broilers	1
CH65-NT	1	Broilers	1
CH7-23	1	Broilers	1
CH7-54*	1	Reproductoras	1
CH94-23	1	Reproductoras	1
CH95-121	1	Reproductoras	1
CH95-31	1	Reproductoras	1
CH19-NT	1	Broilers	1
CH224-NT	1	Reproductoras	1
CH174-NEG	1	Broilers	1

\*: Clonotipos identificados también en cepas bacteriémicas humanas (datos no publicados del LREC-USC). \*: Clonotipos identificados también en carne de pollo (Herrera, 2015).

En total 22 de los 51 clonotipos identificados en las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE también se encontraron en cepas *E. coli* BLEE aisladas de carne de pollo en la ciudad de Lugo (Herrera, 2015) (Tabla 44).

También 14 de los 51 clonotipos identificados en las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE se encontraron en cepas *E. coli* BLEE bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (Datos no publicados del LREC-USC) (Tabla 44).

La determinación de las secuencias tipo se realizó en 52 de las 84 cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE encontrándose un total de 32 secuencias tipo conocidas y tres nuevas secuencias (Tabla 45). La selección de las cepas en la que se estableció su secuencia tipo se realizó siguiendo los siguientes criterios:

1. Seleccionar aquellas cepas que presentaban los 14 clonotipos encontrados también entre las cepas bacteriémicas humanas.
2. Seleccionar aquellas cepas que presentasen el estatus ExPEC.
3. Seleccionar aquellas cepas que presentasen el patotipo APEC.

Como se puede apreciar en las Tablas 45 y 46, y como era de esperar atendiendo a la selección realizada muchas de las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE presentaron secuencias tipo también encontradas entre las cepas bacteriémicas humanas del Hospital Universitario Lucus Augusti.

Como también se puede ver en las Tablas 47, 48 y 49 muchas de las secuencias tipo encontradas en las cepas fecales aviares de esta tesis también se identificaron entre las cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en otros hospitales españoles y en un hospital del norte de Portugal próximo a Galicia.

Las secuencias tipo de las cepas aviarias fecales de *E. coli* productoras de BLEE de esta tesis también se han encontrado con frecuencia entre cepas causantes de brotes de colibacilosis y en aves sanas en un estudio realizado en España y publicado recientemente por Solá-Ginés *et al.*, 2015 (Tabla 50).

**Tabla 45. Combinaciones alélicas y secuencias tipo según la base de datos MLST de Achtman de las cepas aviarias fecales de *E. coli* productoras de BLEE.**

CEPA FV	CEPA	CLONOTIPO	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icD</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	ST Cplx
<b>19231</b>	105Gc	11-54*	10	11	4	8	8	8	2	10	10
<b>19248</b>	192Ga	11-54*	10	11	4	8	8	8	2	10	10
<b>19277</b>	290Ga	11-54*	10	11	4	8	8	8	2	10	10
<b>19311</b>	459Ga	11-54*	10	11	4	8	8	8	2	10	10
<b>19227</b>	101Ga	11-93	10	11	4	8	8	8	2	10	10
<b>19269</b>	263Ga	26-3	4	26	2	25	5	5	19	38	38
<b>19302</b>	424Ga	11-400*	6	11	4	8	8	8	2	48	10
<b>19304</b>	432Ga	11-54*	6	11	4	8	8	8	2	48	10
<b>19244</b>	180Ga	31-27	6	31	5	28	1	1	2	57	350
<b>19217</b>	58Gc	4-39*	6	4	12	1	20	12	7	88	23
<b>19258</b>	216Gb	11-NEG	6	11	4	10	7	8	6	93	168
<b>19266</b>	262Ga	11-31*	6	11	4	10	7	8	6	93	168
<b>19265</b>	261Gb	45-97	20	45	41	43	5	32	2	117	
<b>19268</b>	262Gc	45-97	20	45	41	43	5	32	2	117	
<b>19239</b>	131Ga	39-2	13	39	50	13	16	37	25	135	
<b>19216</b>	58Ga	4-32*	6	4	14	16	24	8	14	155	155
<b>19240</b>	131Gb	4-32*	6	4	14	16	24	8	14	155	155
<b>19309</b>	458Gc	4-32*	6	4	14	16	24	8	14	155	155
<b>19229</b>	105Ga	29-38*	6	29	32	16	11	8	44	156	156
<b>19218</b>	62Ga	65-32	9	65	5	1	9	13	6	162	469
<b>19221</b>	80Ga	65-32	9	65	5	1	9	13	6	162	469
<b>19291</b>	341Gc	65-276	6	65	32	26	9	8	2	297	
<b>19261</b>	248Ga	4-31*	6	4	14	1	20	62	7	345	
<b>19254</b>	214Ga	31-54	6	31	83	28	1	1	2	350	350
<b>19222</b>	84Ga	95-31	6	95	4	88	7	7	7	351	

CEPA FV	CEPA	CLONOTIPO	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icD</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST	ST Cplx
19226	97Ga	41-35*	43	41	15	90	11	8	6	359	
19274	289Ga	41-35*	43	41	15	90	11	8	6	359	
19260	244Ga	4-24*	6	4	12	1	20	18	7	410	23
19310	458Gd	4-24*	6	4	12	1	20	18	7	410	23
19243	173Ga	40-22*	96	40	13	100	23	28	66	428	
19236	110Gb	4-31*	6	4	5	18	11	8	14	533	
19284	322Ga	4-31*	6	4	5	18	11	8	14	533	
19288	334Gd	11-NT	112	11	5	12	8	8	86	542	
19287	334Ga	19-86*	6	19	33	26	11	8	6	602	446
19242	164Gb	11-24	115	11	4	8	92	8	2	608	
19257	216Ga	4-58*	92	4	87	96	70	58	2	648	648
19263	252Ga	4-58*	92	4	87	96	70	58	2	648	648
19307	458Ga	4-58*	92	4	87	96	70	58	2	648	648
19247	191Gb	11-54*	10	11	135	8	8	8	2	744	10
19245	187Ga	95-32	6	95	4	18	11	7	14	1304	
19253	212Gb	6-289*	9	6	162	18	7	8	7	1389	
19290	341Ga	65-32	6	65	3	1	11	13	6	1431	
19294	375Ga	11-23	10	11	5	10	7	8	2	1684	
19298	412Ga	11-23	10	11	5	10	7	8	2	1684	
19300	417Ga	11-23	10	11	5	10	7	8	2	1684	
19267	262Gb	19-NT	9	19	33	18	9	122	6	1800	
19246	191Ga	282-24	6	282	230	1	8	8	173	1818	
19282	321Ga	11-NT	10	11	5	1	7	8	2	3525	
19306	450Ga	486-97	20	486	41	43	5	32	2	3778	
19292	358Pa	19-38	339	19	3	18	9	8	6	Nueva	
19303	425Ga	7-54*	10	7	4	8	12	8	369	Nueva	
19224	92Gb	29-33	112	29	5	26	9	7	7	Nueva	
*: Clonotipos identificados en cepas de <i>E. coli</i> BLEE bacteriémicas humanas (datos no publicados del LREC-USC).											
En verde figuran las secuencias tipo que se encontraron también entre las cepas de <i>E. coli</i> BLEE bacteriémicas humanas aisladas en el Hospital Lucus Augusti. CC= Complejo clonal.											

Tabla 46. Secuencias tipo 96 cepas *E. coli* BLEE bacteriémicas aisladas de pacientes del HULA de Lugo entre 2001 y 2011. Datos del LREC-USC no publicados.

GRUPO FILOGENÉTICO	SECUENCIA TIPO (CC)	CLONOTIPO <i>fumC-fimH<sub>TR</sub></i>	TIPO DE BLEE
A-A	STnew (CC10)	CH11-25	CTX-M-14
A-A	ST10 (CC10)	CH11-54	CTX-M-32
			SHV-12
A-A	ST48 (CC10)	CH11-0	CTX-M-14
A-A	ST617 (CC10)	CH11-negative	CTX-M-14
A-A	ST93 (CC168)	CH11-31	CTX-M-14
A-A	ST609 (CC46)	CH7-0	CTX-M-14
A-A	ST615 (CC46)	CH7-34	CTX-M-14
A-A	ST1421	CH7-54	CTX-M-1
A-A	ST1630	CH11-400	CTX-M-1
A-C	ST23 (CC23)	CH4-35	CTX-M-14
A-C	ST88 (CC23)	CH4-39	CTX-M-14
A-C	ST410 (CC23)	CH4-24	CTX-M-15
A-C	ST58 (CC155)	CH4-25	CTX-M-14
A-C	ST1615	CH263-32	CTX-M-14
B1-B1	ST58 (CC155)	CH4-32	CTX-M-14
			CTX-M-14
		CH4-0	CTX-M-1
B1-B1	ST156 (CC156)	CH29-38	CTX-M-15
			CTX-M-14
B1-B1	ST1642	CH4-31	CTX-M-14
	ST345		CTX-M-1
B1-B1	ST359	CH41-35	CTX-M-14
			CTX-M-14
			CTX-M-32
B1-B1	ST453 (CC86)	CH6-31	CTX-M-14
	ST1196		CTX-M-14
B1-B1	ST641 (CC86)	CH6-479	CTX-M-1



GRUPO FILOGENÉTICO	SECUENCIA TIPO (CC)	CLONOTIPO <i>fumC-fimH</i> <sub>TR</sub>	TIPO DE BLEE
B1-B1	ST602 (CC446)	CH19-86	SHV12
			CTX-M-9
B1-B1	ST711	CH6-289	CTX-M-9
B1-B1	ST2602	CH95-38	CTX-M-1
B2-B2	ST95 (CC95)	CH38-27	CTX-M-32
B2-B2	ST131(CC131)	CH40-22	CTX-M-9
			SHV-12
		CH40-30	CTX-M-15
		CH40-negative	CTX-M-14
		CH40-41	CTX-M-14
CTX-M-14			
B2-B2	ST141	CH52-14	CTX-M-14
B2-B2	ST352	CH96-9	CTX-M-14
D-D	ST69 (CC69)	CH35-27	CTX-M-14
D-E	ST106 (CC69)	CH35-47	CTX-M-14
D-E	ST362	CH100-96	CTX-M-1
D-E	ST393	CH106-54	CTX-M-14
D-E	ST405	CH37-27	CTX-M-15
			CTX-M-15
			CTX-M-15
			CTX-M-14
D-E	ST973	CH187-27	CTX-M-1
D-F	ST354 (CC354)	CH88-58	CTX-M-14
			CTX-M-14
			CTX-M-14
D-F	ST648 (CC648)	CH4-58	SHV-12
			CTX-M-32

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias con cepas *E. coli* BLEE aviares fecales de esta tesis.

**Tabla 47. Secuencias tipo de 91 cepas *E. coli* BLEE aisladas de muestras clínicas (69% de orina) en 11 hospitales españoles en 2004 (Oteo *et al.*, 2009).**

A	CC10	ST10 (1) (1)	SHV12 (1) OTRA (1)
		ST48 (1)	CTXM14 (1)
		ST167 (1) (2) (2)	CTXM14 (1) SHV12 (2) OTRA (2)
		ST193 (2)	CTXM9 (2)
		ST227 (1)	SHV12 (1)
		ST617 (2)	CTXM14 (2)
	CC23	ST23 (2) (2)	CTXM14 (2) SHV12 (2)
		ST88 (1) (1)	CTXM14 (1) OTRA (1)
		ST410 (1) (1)	CTXM14 (1) OTRA (1)
		ST612 (1)	CTXM14 (1)
		ST650 (1)	CTXM14 (1)
	CC46	ST609 (1)	OTRA (1)
		ST615 (2)	CTXM14 (2)
	CC168	ST93 (2)	SHV12 (2)
	CC350	ST57 (1)	CTXM14 (1)
	Singletons	ST401 (1) (2)	CTXM9 (1) OTRA (2)
		ST540 (1)	OTRA (1)
		ST605 (1)	SHV12 (1)
		ST607 (1)	CTXM9 (1)
		ST608 (1)	SHV12 (1)
		ST614 (1)	CTXM14 (1)
B1	CC101	ST101 (1)	CTXM14 (1)
		ST604 (1)	SHV12 (1)
		ST619 (1)	CTXM14 (1)
	CC155	ST616 (1)	CTXM14 (1)
		ST621 (1)	CTXM14 (1)
	CC156	ST156 (1)	CTXM9 (1)
		ST348 (1)	CTXM14 (1)
		ST611 (1)	CTXM14 (1)
	CC446	ST602 (4)	CTXM9 (4)
	Singletons	ST196 (1)	CTXM14 (1)
		ST224 (2) (1)	CTXM14 (2) SHV12 (1)
		ST297 (1)	SHV12 (1)
		ST359 (3) (1)	CTXM14 (3) CTXM9 (1)
		ST600 (1)	CTXM9 (1)
		ST603 (1)	OTRA
		ST606 (1)	CTXM9 (1)
		ST610 (1)	CTXM14 (1)
		ST649 (1)	CTXM14 (1)

B2	CC131	ST131 (1) (1) (2) (4)	CTXM14 (1) SHV12 (1) CTXM9 (2) OTRA (4)
	CC354	ST623 (1)	CTXM14 (1)
	CC538	ST620 (1)	CTXM14 (1)
	Singletons	ST622 (1)	CTXM14 (1)
		ST625 (1)	CTXM14 (1)
		ST653 (1)	OTRA (1)
D	CC31	ST130 (1)	CTXM14 (1)
		ST393 (1)	CTXM14 (1)
		ST613 (1)	CTXM14 (1)
	CC38	ST38 (1)	CTXM14 (1)
	CC59	ST59 (1)	CTXM9 (1)
	CC69	ST69 (1)	CTXM14 (1)
	CC350	ST57 (1)	SHV12 (1)
	CC354	ST354 (1)	SHV12 (1)
	CC538	ST538 (2)	CTXM14 (2)
	Singletons	ST117 (1) (2)	SHV12 (1) CTXM9 (2)
		ST127 (1)	SHV12 (1)
		ST624 (1)	CTXM14 (1)

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias con cepas *E. coli* BLEE aviares fecales de esta tesis.

**Tabla 48. Secuencias tipo de 39 cepas *E. coli* BLEE aisladas de bacteriemias de origen urinario en ocho hospitales españoles en 2010 y 2011 (Merino *et al.*, 2016).**

A	ST167 (1)	CTX-M-14 (1)
	ST369 (1)	CTX-M-14 (1)
	ST609 (1)	CTX-M-1 (1)
C	ST410 (2)	SHV-12 (2)
B1	ST57 (1)	CTX-M-1 (1)
	ST156 (2)	CTX-M-14 (2)
	ST224 (3)	CTX-M-14 (2) SHV-12 (1)
	ST359 (1)	CTX-M-14 (1)
	ST448 (1)	SHV-12 (1)
	ST453 (1)	CTX-M-14 (1)
B2	ST131 (21)	CTX-M-15 (20) CTX-M-14 (1)
D	ST69 (1)	SHV-12 (1)
	ST405 (1)	CTX-M-14 (1)
	ST1011 (1)	CTX-M-14 (1)
	NO TIPABLE (1)	CTX-M-15 (1)

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias con cepas *E. coli* BLEE aviares fecales de esta tesis.

**Tabla 49.** Secuencias tipo de 112 cepas *E. coli* BLEE aisladas entre 2002 y 2007 en un hospital del norte de Portugal (Oporto) (Rodrigues *et al.*, 2015).

GRUPO FILOGENÉTICO	COMPLEJO CLONAL	SECUENCIA TIPO	TIPO DE BLEE
A (16)	CC10	ST10 (3)	CTX-M-2 (1), CTX-M-15 (2)
		ST167	CTX-M-1
		ST744	SHV-12
	CC23	ST88	TEM-52
		ST410	CTX-M-15
		ST4270 (2)	CTX-M-14 (2)
	CC168	ST93 (3)	CTX-M-1 (1), CTX-M-14 (1), CTX-M-32 (1)
		ST1594	SHV-12
	Singletons	ST4269 (2)	CTX-M-32 (2)
B1 (17)	CC155	ST58 (2)	CTX-M-14, SHV-12
		ST155 (2)	CTX-M-1 (2)
	CC205	ST205	CTX-M-1
	CC448	ST448	CTX-M-14
	CC86	ST453 (2)	CTX-M-14, SHV-12
	CC101	ST2229	CTX-M-14
	Singletons	ST212	SHV-12
		ST224 (2)	CTX-M-9, SHV-12
		ST1196 (2)	SHV-12 (2)
		ST1642 (2)	CTX-M-14 (2)
		ST4476	CTX-M-14
B2 (66)	CC131 (65)	ST131 (65)	CTX-M-15 (62), CTX-M-1 (1), CTX-M-14 (1), CTX-M-32 (1)
	CC28 (1)	ST4504 (1)	CTX-M-2 (1)
D (13)	CC350	ST57 (3)	CTX-M-1 (1), CTX-M-14 (2)
	CC117	ST117 (2)	CTX-M-1 (2)
		ST2974	SHV-12
	CC354	ST354	CTX-M-14
	CC648	ST648	TEM-52
		ST3177	CTX-M-15
	Singletons	ST363	CTX-M-1
		ST457	CTX-M-79
		ST1011 (2)	CTX-M-1 (1), CTX-M-32 (1)

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias con cepas *E. coli* BLEE aviares fecales de esta tesis.

**Tabla 50. Secuencias tipo de 22 cepas de *E. coli* aisladas de brotes de colibacilosis en pollos y 10 cepas fecales de pollos sanos de España (Solà-Ginés *et al.*, 2015).**

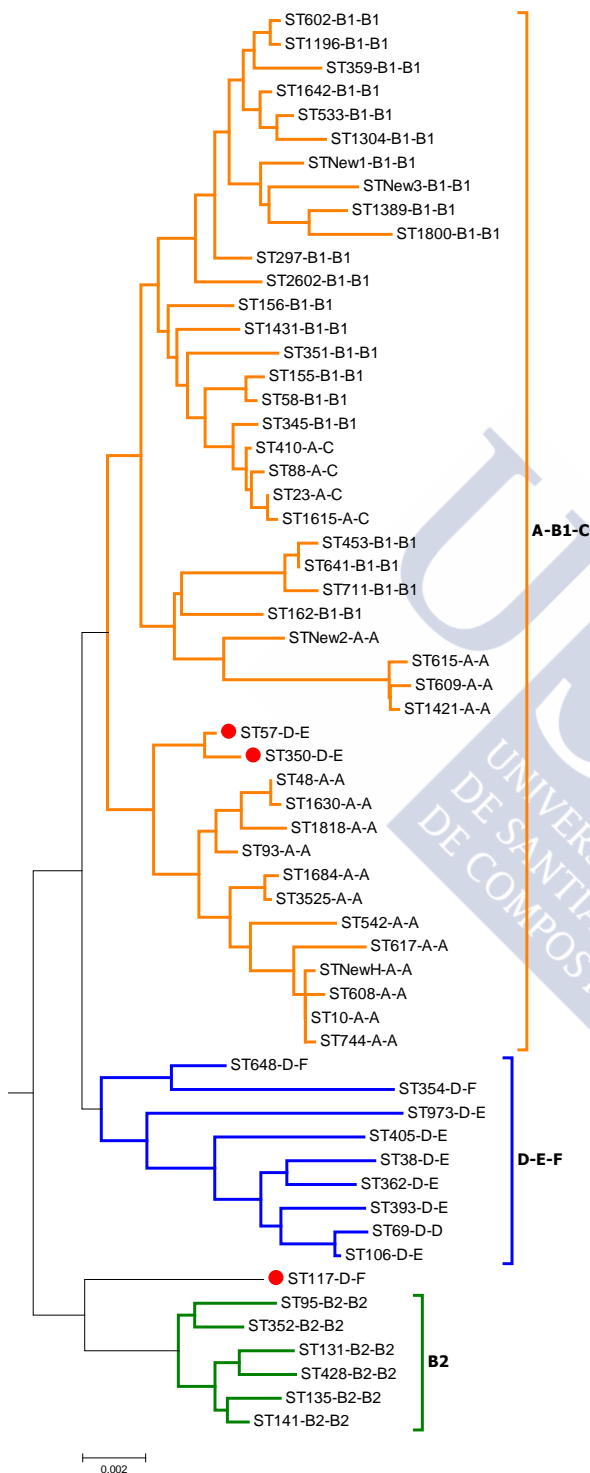
GRUPO FILOGENÉTICO	COMPLEJO CLONAL	SECUENCIA TIPO	SEROTIPO	BLEE CMY-2	PATOTIPO APEC	AVE
A	CC10	ST10	O2:H40	No	No	sana
	CC10	ST10	O53:H18	No	No	sana
	CC10	ST10	ONT:HNT	No	No	sana
	CC10	ST48	O6:H16	No	Si	enferma
	CC168 (2)	ST93 (2)	O5:H51 (2)	No (2)	Si (2)	enferma (2)
	CC168	ST93	O5:H10	No	Si	enferma
	CC168	ST168	O5:H10	No	Si	enferma
	CC165	ST165	O3:H26	CTX-M-14	No	sana
	CC165	ST165	O3:HNM	No	No	sana
	CC165	ST189	O3:H26	No	No	sana
	Singletons	ST1137	O88:HNM	CTX-M-14	Si	enferma
B1	CC101	ST101	O15:H10	CTX-M-14	Si	enferma
	CC156	ST156	ONT:H28	SHV-2	Si	enferma
	Singletons	ST295	ONT:H16	No	Si	enferma
	Singletons	ST297	O127:H37	No	No	sana
	Singletons	ST539	O159:H28	No	Si	enferma
	Singletons	ST533	O45:H8	SHV-12	No	enferma
	Singletons	ST889	ONT:H51	CTX-M-14	Si	enferma
B2	CC131	ST131	O25b:H4	CMY-2	Si	sana
	Singletons	ST429	O2:H1	CMY-2	Si	enferma
C	CC23	ST23	O78:H9	No	Si	enferma
	CC23	ST650	O78:H9	No	Si	enferma
D	CC117	ST117	ONT:H4	No	No	sana
	CC156	ST156	ONT:H51	CTX-M-14	Si	enferma
	Singletons	ST624	O25a:H4	No	Si	enferma
	Singletons	ST830	ONT:H4	No	Si	enferma
	Singletons	ST3161	O11:H15	No	Si	enferma
E	CC350	ST350	ONT:H27	CTX-M-14	Si	enferma
	CC350	ST350	O119:H27	SHV-12	No	enferma
	CC350	ST57	O102:H25	No	Si	enferma
F	CC648	ST648	O83:HNT	No	Si	sana

NOTA: En fondo gris se resaltan las coincidencias con cepas *E. coli* BLEE aviares fecales de esta tesis.

#### 4.1.8 *Árbol filogenético basado en las secuencias tipo.*

Nosotros hemos determinado los grupos filogenéticos por PCR siguiendo los esquemas desarrollados por Clermont et al. (2000 y 2013). No obstante, según los encuentros de Turrientes et al. (2014) habría que tener también en cuenta las secuencias tipo de la cepas para poder asignar correctamente el grupo filogenético. Por ello hemos construido un árbol filogenético elaborado a partir de la concatenación de las secuencias nucleotídicas de los genes de MLST (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*), usando el método de Neighbor-Joining de MEGA6. En dicho árbol incluimos las 61 secuencias tipo que hemos encontrado entre las cepas de *E. coli* aviaries fecales productoras de BLEE de este estudio y las encontradas en las cepas bacteriémicas productoras de BLEE aisladas de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti.

Como se puede ver en la Figura 39, el árbol filogenético generado presenta tres cluster que hemos resaltado en color naranja, azul y verde. En el cluster naranja se agrupan las cepas de los grupos filogenéticos A, B1 y C, en el cluster azul las cepas de los grupos filogenéticos D, E y F, y en el cluster resaltado en verde las cepas del grupo filogenético B2. Por lo tanto nuestros resultados coinciden con los de Turrientes et al. (2014) en el sentido de la generación de estos tres grandes clusters. Al observar el árbol filogenético vemos que cuatro secuencias tipo encontradas en cepas aviaries fecales se situaban en lugares no esperados: ST57 (D-E), ST350 (D-E), ST117 (D-F) y ST3778 (D-F). Concretamente la ST57 (D-E) y ST350 (D-E), ambas del complejo clonal ST350, se engloban en el cluster de A, B1 y C. En el caso de la ST117 (D-F) más cerca de las B2 que de las D-E-F y en el caso de la ST3778 (D-F) muy separada del resto de las secuencias tipo y por lo tanto fuera de los tres grandes clusters (no se muestra en la figura).



**Figura 39.** Árbol filogenético elaborado a partir de la concatenación de secuencias nucleotídicas de los genes de MLST (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*), usando el método de Neighbor-Joining de MEGA6. El círculo rojo indica aquellas STs que no quedan agrupadas con las STs de los mismos grupos filogenéticos.

#### 4.1.9 Comparación entre *E. coli* BLEE aviares y humanos

En el apartado anterior hemos visto que muchas de las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE de este estudio presentaban clonotipos y secuencias tipo también encontradas entre las cepas *E. coli* BLEE bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (Datos no publicados del LREC-USC) (Tablas 45 y 46).

En este apartado analizamos si las cepas aviares fecales y las bacteriémicas humanas que presentan los mismo clonotipos, también presentan las mismas secuencias tipo, serotipos, genes de virulencia y producen el mismo tipo de enzima BLEE (Tablas 51 a 62).

En la Tabla 51 se comparan dos cepas aviares fecales con otras dos cepas humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del clonotipo CH11-31. Las cuatro cepas presentaron la secuencia tipo ST93 y tres de ellas el serotipo O7:H4 y eran productoras del enzima CTX-M-14. Además, las cuatro cepas poseen el estatus ExPEC y APEC, y poseen un perfil de genes de virulencia muy similar compartiendo 11 genes de virulencia en común (*papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC traT ompT*). Aquí tenemos un caso muy claro de cepas de origen aviar que son prácticamente idénticas y que por lo tanto se puede decir que pertenecen al mismo clon que cepas que causan infecciones en seres humanos. No obstante, sería muy interesante que en futuros estudios se pudiese secuenciar el genoma completo de estas cuatro cepas para confirmar dicha hipótesis.

En la Tabla 52 se compara una cepa aviar fecal y una humana bacteriémica de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del clonotipo CH7-54. En este caso, vemos que aunque ambas cepas producen la enzima CTX-M-1 y tienen un



perfil de genes de virulencia similar (*fimH* versus *fimH ompT*), sus secuencias tipo son totalmente diferentes diferenciándose en cuatro de siete alelos. Por lo tanto podemos decir que ambas cepas pertenecen a clones diferentes.

En la Tabla 53 se comparan ocho cepas aviarias fecales con cinco cepas humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del complejo clonal 10, que en su mayoría presentaron el clonotipo CH11-54 y la secuencia tipo ST10. Aunque no encontramos ninguna cepa de origen aviar que comparta todas sus características con alguna de las cinco cepas de origen humano si que observamos que las cepas de origen aviar y humano poseen perfiles de genes de virulencia muy similares con la presencia característica del gen *fimAvMT78*. Es evidente que en este caso sería fundamental realizar la secuenciación completa del genoma de estas cepas para poder definir mejor el grado de relación de las mismas.

En la Tabla 54 se comparan tres cepas aviarias con otras tres cepas humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A/C y del complejo clonal 23. Vemos que dos cepas aviarias presentan el mismo clonotipo (CH 4-24) y la misma secuencia tipo (ST410) que una de las cepas humanas, pero las cepas aviarias presentan un serotipo (ONT:H51) y producen una enzima BLEE (SHV-12) diferentes que la cepa humana (O20:H9 y CTX-M-15). Además las dos cepas aviarias poseen perfiles de genes de virulencia muy distintos al de la cepa humana. Parece evidente que en este caso la relación entre las cepas aviarias y humanas es también bastante limitada.

En la Tabla 55 se comparan tres cepas aviarias fecales con otras tres cepas humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH4-31. Únicamente una de las cepas aviarias presentó la misma secuencia tipo (ST345) que una cepa humana. Las otras dos cepas aviarias presentaron la

secuencia tipo ST533 que pertenece al mismo complejo clonal que la ST1642 encontrada en las dos cepas humanas. Mientras que las dos cepas ST345 producen distintos tipos de enzimas BLEE (SHV12 y CTX-M-1), las cuatro cepas ST533 y ST1642 resultaron ser CTX-M-14 positivas. Se da la circunstancia que la ST345 (6-4-14-1-20-62-7) difiere en cinco alelos con respecto a las secuencias tipo ST533 (6-4-5-18-11-8-14) y ST1642 (6-4-5-18-11-8-6). Por lo tanto en este caso aunque se dan notables coincidencias entre las características cepas de origen aviar con las humanas también se registran diferencias significativas que también afectan al perfil de genes de virulencia.

En la Tabla 56 se comparan tres cepas aviares fecales con otras tres humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1: cinco del clonotipo CH4-32 y una CH4-NT. Aunque las seis cepas pertenecen al complejo clonal 155 (CC155) las tres aviares presentan la secuencia tipo ST155 (6-4-14-16-24-8-14) mientras que las tres humanas son ST58 (6-4-4-16-24-8-14). Además, se da la circunstancia que el perfil de genes de virulencia de las tres cepas aviares es muy diferente al de las cepas humanas. No obstante, dos cepas aviares producen la misma BLEE (CTX-M-14) que dos de las cepas humanas. Es evidente que estamos ante otro caso donde se producen notables coincidencias entre las características de las cepas humanas y aviares, pero también diferencias muy significativas.

En la Tabla 57 se comparan dos cepas aviares fecales con tres humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH41-35. En este caso vemos que las cinco cepas pertenecen a la secuencia tipo ST359 y que una de las cepas aviares produce el mismo tipo de enzima BLEE (CTX-M-14) que dos de las cepas humanas. No obstante el perfil de genes de virulencia de las cepas aviares difiere con respecto al de las cepas humanas,

en lo que se refiere al gen *tsh* presente únicamente en las dos cepas aviares. De nuevo estamos ante otro caso de muchas coincidencias, pero también de diferencias significativas que en este caso afectan especialmente a los serotipos de las cepas. Así, las cepas aviares pertenecen a los serotipos O20:H21 y O105:H21 mientras que las humanas a los serotipos O25a:H25 y ONT:H51.

En la Tabla 58 se compara una cepa aviar fecal con dos humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH29-38. Las tres cepas presentaron la secuencia tipo ST156 y poseen un perfil de genes de virulencia similar, pero difieren en el tipo de enzima BLEE producido y en los serotipos. Otro caso de notables coincidencias y de diferencias significativas, donde la secuenciación del genoma completo podría arrojar mucha luz sobre la relación entre las cepas.

En la Tabla 59 se compara una cepa aviar fecal con dos humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH19-86. Las tres cepas presentaron la secuencia tipo ST602 y las tres poseen un perfil de genes de virulencia muy similar. Además, una cepa humana produce el mismo tipo de enzima BLEE (SHV-12) que la cepa aviar, comparten el antígeno flagelar H21 y el estatus APEC. Es cierto que en este caso las coincidencias son muy evidentes, pero de nuevo la secuenciación de genoma completo sería vital para definir la relación entre la cepa aviar y las humanas.

En la Tabla 60 se compara una cepa aviar fecal y una humana bacteriémica de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH6-289. En este caso es evidente que no hay relación clonal entre las cepas ya que pertenecen a dos secuencias tipo (ST711: 9-6-15-131-24-7-7 y ST1389: 9-6-162-18-7-8-7) que difieren en cuatro alelos.

En la Tabla 61 se compara una cepa aviar fecal con tres humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B2 y del clonotipo CH40-22. Como en el caso anterior las secuencias tipo de las cepas no se encuentran clonalmente relacionadas ya que difieren en cinco alelos (En aves ST428: 96-40-13-100-23-28-66 y en humanos ST131: 53-40-47-13-36-28-29).

En la Tabla 62 se comparan tres cepas aviares fecales con dos humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético D/F y del clonotipo CH4-58. Las cinco cepas poseen la secuencia tipo ST648 y perfiles de genes de virulencia muy similares presentando las cinco el estatus ExPEC. Aunque se diferencian en sus serotipos, el grado de semejanza entre las cepas es muy evidente, pero en este caso de nuevo la secuenciación del genoma completo sería la prueba definitiva necesaria para definir el grado de relación entre las cepas de origen humano y animal.



**Tabla 51. Comparación entre cepas aviares fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del clonotipo CH11-31.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19266-262Ga</b>	A/A	CH11-31	ST93 (cc168)	O7:H4	CTX-M-14	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC iss traT ompT</i>	14	ExPEC, APEC
<b>FV19258-216Gb</b>	A/A	CH11-NEG	ST93 (cc168)	O11:H12	CTX-M-1	<i>pacC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA kpsM II-K5 cvaC iss traT</i>	13	ExPEC, APEC
<b>H3066</b>	A/A	CH11-31	ST93 (cc168)	O7:H4	CTX-M-14	<i>fimH papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC iss traT ompT</i>	13	ExPEC, APEC
<b>H3286</b>	A/A	CH11-31	ST93 (cc168)	O7:H4	CTX-M-14	<i>fimH papC papEF papGII tsh hlyF iucD iutA iroN kpsM II-K5 cvaC traT ompT</i>	13	ExPEC, APEC

**Tabla 52. Comparación entre una cepa aviar fecal y una humana bacteriémica de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del clonotipo CH7-54.**

CEPAS	FILOGRUPO Clermont <i>et al.</i> , 2000/2013	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19303-425 G a</b>	A/A	CH7-54	ST-Nuevo	ONT:H11	CTX-M-1	<i>fimH</i>	1	
<b>H3453</b>	A/A	CH7-54	ST1421	O9:H4	CTX-M-1	<i>fimH ompT</i>	2	
<b>Combinaciones alélicas (<i>adh fumC gyrB icD mdh purA recA</i>): ST-nuevo (10-7-4-8-12-8-369) y ST1421 (8-7-1-8-8-8-2)</b>								

**Tabla 53. Comparación entre cepas aviarias fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A y del complejo clonal 10.**

CEPAS	FILOGRUPO Clermont <i>et al.</i> , 2000/2013	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19231-105Gc</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O27:H12	SHV-12	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i>	2	
<b>FV19247-191Gb</b>	A/A	CH11-54	ST744 (cc10)	O101:HNM	SHV-12	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>hlyF traT</i>	4	
<b>FV19248-192Ga</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O153:H10	CTX-M-32	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>fyuA traT</i>	4	
<b>FV19277-290Ga</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O135:HNM	CTX-M-1	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>hlyF iroN iss</i> <i>traT</i>	6	
<b>FV19304-432Ga</b>	A/A	CH11-54	ST48 (cc10)	O8:H11	CTX-M-1	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>hlyF iroN traT</i>	5	

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19311-459Ga</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	ONT:H2	SHV-12	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i>	2	
<b>FV19227-101Ga</b>	A/A	CH11-93	ST10 (cc10)	O171:H4	<b>CTX-M14LIKE</b>	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>papC papEF</i> <i>papGII fyuA</i>	6	
<b>FV19302-424Ga</b>	A/A	CH11-400	ST48 (cc10)	ONT:HNM	SHV-2	<i>fimH cvaC traT</i> <i>ompT</i>	4	
<b>H2029</b>	A/A	CH11-25	ST Nuevo (cc10)	ONT:H4	CTX-M-14	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>iucD iutA traT</i>	5	
<b>H2643</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	O101:H10	CTX-M-32	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>hlyF iucD iutA</i> <i>lroN cvaC iss</i> <i>traT</i>	9	APEC
<b>H2961</b>	A/A	CH11-54	ST10 (cc10)	ONT:H-	SHV-12	<i>fimH</i> <i>fimAvMT78</i> <i>yfcV hlyF iss</i> <i>traT</i>	6	
<b>H1656</b>	A/A	CH11-NT	ST48 (cc10)	O8:H11	CTX-M-14	<i>fimH iss traT</i> <i>ompT</i>	4	
<b>H2912</b>	A/A	CH11-NEG	ST617 (cc10)	O101:H10	CTX-M-14	<i>malX</i>	1	
Combinaciones alélicas ( <i>adh fumC gyrB icD mdh purA recA</i> ): ST744 (10-11-135-8-8-8-2), ST10 (10-11-4-8-8-8-2), ST48 (6-11-4-8-8-8-2), ST NUEVO (10-11-4-8-492-8-2), ST617 (10-11-4-8-8-13-73).								



**Tabla 54. Comparación entre cepas aviares fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético A/C y del complejo clonal 23.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19260-244Ga</b>	A/C	CH4-24	ST410 (cc23)	ONT:H51	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	4	
<b>FV19310-458Gd</b>	A/C	CH4-24	ST410 (cc23)	ONT:H51	SHV-12	<i>fimH hlyF iroN iss traT</i>	5	
<b>FV19217-58Gc</b>	A/C	CH4-39	ST88 (cc23)	O45:H9	CTX-M-1	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA cvaC iss traT ompT</i>	11	APEC
<b>H2411</b>	A/C	CH4-24	ST410 (cc23)	O20:H9	CTX-M-15	<i>fimH iucD iutA fyuA</i>	4	
<b>H3192</b>	A/C	CH4-39	ST88 (cc23)	O8:H4	CTX-M-14	<i>fimH papAH papC papEF hlyF iucD iutA iroN fyuA cvaC traT ompT</i>	12	ExPEC APEC
<b>H2440</b>	A/C	CH4-35	ST23 (cc23)	ONT:HNM	CTX-M-14	<i>fimH papAH papC papEF tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA cvaC iss traT ompT</i>	15	ExPEC APEC
<b>Combinaciones alélicas (<i>adh fumC gyrB icD mdh purA recA</i>): ST410 (6-4-12-1-20-18-7), ST88 (6-4-12-1-20-12-7) y ST23 (6-4-12-1-20-13-7).</b>								

**Tabla 55. Comparación entre cepas aviarias fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH4-31.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19236-110 G b</b>	B1/B1	CH4-31	ST533	O9:H31	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iss traT malX ompT</i>	8	APEC
<b>FV19261-248 G a</b>	B1/B1	CH4-31	ST345	O2:H11	SHV-12	<i>fimH iucD iroN cvaC iss ompT</i>	6	
<b>FV19284-322 G a</b>	B1/B1	CH4-31	ST533	O20:H14	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT malX ompT</i>	10	APEC
<b>H2180</b>	B1/B1	CH4-31	ST345	O8:HNT	CTX-M-1	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	8	APEC
<b>H1846</b>	B1/B1	CH4-31	ST1642	O8:H7	CTX-M-14	<i>fimH iucD iutA</i>	3	
<b>H3389</b>	B1/B1	CH4-31	ST1642	O8:H7	CTX-M-14	<i>fimH malX</i>	2	
<b>Combinaciones alélicas (<i>adh fumC gyrB icd mdh purA recA</i>): ST533 (6-4-5-18-11-8-14), ST345 (6-4-14-1-20-62-7) y ST1642 (6-4-5-18-11-8-6).</b>								

**Tabla 56. Comparación entre cepas aviares fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH4-32.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19216-58 G a</b>	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	O51:H4	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iroN iss</i>	4	
<b>FV19240-131 G b</b>	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	ONT:H21	SHV-12	<i>fimH</i>	1	
<b>FV19309-458 G c</b>	B1/B1	CH4-32	ST155 (cc155)	ONT:H51	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iroN cvaC iss</i>	5	
<b>H2469</b>	B1/B1	CH4-32	ST58 (cc155)	ONT:HNM	CTX-M-14	<i>fimH papAH papC papEF iucD iutA fyuA traT ompT</i>	9	ExPEC
<b>H2474</b>	B1/B1	CH4-32	ST58 (cc155)	ONT:H25	CTX-M-14	<i>fimH papAH papC papEF tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA cvaC iss traT ompT</i>	15	ExPEC APEC
<b>H3307</b>	B1/B1	CH4-NT	ST58 (cc155)	O54:H21	CTX-M-1	<i>fimH yfcV hlyF vat fyuA traT ompT</i>	7	UPEC
<b>Combinaciones alélicas (<i>adk fumC gyrB icD mdh purA recA</i>): ST155 (6-4-14-16-24-8-14) y ST58 (6-4-4-16-24-8-14).</b>								

**Tabla 57. Comparación entre cepas aviarias fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH41-35.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19226-97 G a</b>	B1/B1	CH41-35	ST359	O20:H21	CTX-M-14	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	8	APEC
<b>FV19274-289 G a</b>	B1/B1	CH41-35	ST359	O20:H21	SHV-12	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	8	APEC
<b>H1541</b>	B1/B1	CH41-35	ST359	O105:H21	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA traT</i>	5	
<b>H1628</b>	B1/B1	CH41-35	ST359	O25a:H25	CTX-M-32	<i>fimH iucD iutA traT malX ompT</i>	6	
<b>H2461</b>	B1/B1	CH41-35	ST359	ONT:H51	CTX-M-14	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN cvaC iss</i>	7	APEC

**Tabla 58. Comparación entre una cepa aviar fecal y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH29-38.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19229-105 G a</b>	B1/B1	CH29-38	ST156 (cc156)	O55,19:HNM	CTX-M-9	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN traT</i>	6	
<b>H2509</b>	B1/B1	CH29-38	ST156 (cc156)	O20:H30	CTX-M-15	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	9	APEC
<b>H3312</b>	B1/B1	CH29-38	ST156 (cc156)	O23:H28	CTX-M-14	<i>fimH iucD iutA iroN traT</i>	5	

**Tabla 59. Comparación entre una cepa aviar fecal y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH19-86.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19287-334 G a</b>	B1/B1	CH19-86	ST602 (cc446)	O18:H21	SHV-12	<i>fimH tsh hlyF iucD iutA iroN cvaC iss traT</i>	9	APEC
<b>H1522</b>	B1/B1	CH19-86	ST602 (cc446)	O144:HNM	CTX-M-9	<i>fimH tsh iucD iutA iroN iss traT ompT</i>	8	APEC
<b>H2845</b>	B1/B1	CH19-86	ST602 (cc446)	O68:H21	SHV-12	<i>fimH hlyF iucD iutA iroN iss traT</i>	7	APEC

**Tabla 60.** Comparación entre una cepa aviar fecal y una humana bacteriémica de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B1 y del clonotipo CH6-289.

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19253-212 G b</b>	B1/B1	CH6-289	ST1389	ONT:H10	SHV-12	<i>fimH fyuA traT ompT</i>	4	
<b>H2165</b>	B1/B1	CH6-289	ST711	ONT:H10	CTX-M-9	<i>fimH hlyA ompT</i>	3	
Combinaciones alélicas ( <i>adh fumC gyrB icd mdh purA recA</i> ): ST1389 (9-6-162-18-7-8-7) y ST711 (9-6-15-131-24-7-7)								

**Tabla 61. Comparación entre una cepa aviar fecal y varias cepas humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético B2 y del clonotipo CH40-22.**

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19243-173 G a</b>	B2/B2	CH40-22	ST428	O120:H4	CTX-M-1	<i>fimH fimAvMT78 yfcV tsh hlyF vat iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II- K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	18	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H2262</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	CTX-M-9	<i>fimH papC papAH papEF papGIII yfcV cdtB hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II- K5 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	21	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H3044</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	CTX-M-9	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II- K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H3345</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	SHV-12	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II- K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>Combinaciones alélicas (<i>adk fumC gyrB icD mdh purA recA</i>): ST428 (96-40-13-100-23-28-66) y ST131 (53-40-47-13-36-28-29)</b>								

**Tabla 62. Comparación entre cepas aviares fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* productoras de BLEE del grupo filogenético D/F y del clonotipo CH4-58.**

CEPAS	FILOGRUPO Clermont <i>et al.</i> , 2000/2013	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO DE BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19257-216 G a</b>	D/F	CH4-58	ST648 (CC648)	ONT:H4	CTX-M-1	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	14	ExPEC UPEC
<b>FV19263-252 G a</b>	D/F	CH4-58	ST648 (CC648)	O1:H42	CTX-M-9	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT malX ompT</i>	15	ExPEC UPEC APEC
<b>FV19307-458 G a</b>	D/F	CH4-58	ST648 (CC648)	ONT:HNM	CTX-M-32	<i>fimH papC papEF papGII yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	14	ExPEC UPEC
<b>H1610</b>	D/F	CH4-58	ST648 (CC648)	O25:HNM	CTX-M-32	<i>fimH yfcV hlyF iucD iutA fyuA chuA kpsM II-K5 traT malX ompT</i>	11	ExPEC UPEC
<b>H3188</b>	D/F	CH4-58	ST648 (CC648)	O2:HNM	SHV-12	<i>fimH papAH papC papEF papGIII yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN chuA kpsM II- K5 cvaC iss traT malX ompT</i>	18	ExPEC APEC





## 4.2 Grupo clonal ST131

### 4.2.1 Prevalencia

Investigamos la presencia del grupo clonal ST131 de *E. coli* mediante PCR convencional de los confluentes obtenidos en las placas de agar MacConkey Lactosa. Se realizó la detección del gen que codifica para el antígeno O25b (*rfbO25b*) en las 460 muestras recogidas en este estudio.

Se detectaron cepas de *E. coli* con el gen *rfbO25b* en ocho (4%) de las 198 explotaciones muestreadas. De estas ocho explotaciones, tres correspondían a broilers (37,5%) y cinco a reproductoras de multiplicación carne (62,5%).

Una explotación con las mismas gallinas reproductoras muestreadas en dos años consecutivos resultó positiva para el gen *rfbO25b* en los dos años. Además, hubo otra explotación de reproductoras que tenía cinco manadas en el momento del muestreo pero sólo se encontró este gen en dos de ellas.

En las ocho explotaciones positivas se encontraron cepas de *E.coli rfbO25b* en nueve manadas (tres de broilers y seis de reproductoras), aislándose un total de 10 cepas.

Las 10 cepas aviares fecales aisladas en este estudio que presentaban el gen *rfbO25b* al realizar el serotipado se comprobó que pertenecían al serotipo O25:H4. Mediante PCR se demostró que pertenecían al filogruppo B2 y por secuenciación se confirmó que tenían la secuencia tipo ST131.

#### 4.2.2 Patrones de resistencias y $\beta$ -lactamasas

Las 10 cepas aviarias fecales de *E. coli* ST131 de este estudio resultaron no ser productoras de enzimas BLEE. No obstante, cuatro de ellas eran productoras de la enzima AmpC de tipo CMY-2. En contraste, de las 29 cepas de *E. coli* ST131 aisladas en 28 (14%) de 200 pechugas de pollo adquiridas en establecimientos comerciales de la ciudad de Lugo en los años 2009 y 2010, siete resultaron ser productoras de CTX-M-9 y seis de CMY-2 (Herrera, 2015).

El estudio de sensibilidad de las 10 cepas de *E. coli* ST131 mediante el sistema automatizado Phoenix reveló siete patrones de resistencia distintos (Tabla 63). Las cuatro cepas productoras de la enzima CMY-2 resultaron ser resistentes a la ampicilina, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima y a la amoxicilina-clavulánico.

**Tabla 63. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas O25b:H4-B2.**

Patrón	Nº cepas	%	B	P	R	P	Cepa	AN	GM	AM	ATM	CFZ	FOX	CTX	CAZ	AMC	CIP	LVX
1	1	10	0	0	1	0	417 G b	R				R					R	I
2	2	20	0	0	2	0	305 G a 375 G b			R		R						
3	1	10	1	0	0	0	289 G c			R		R	R	R	I	R		
4	3	30	2	0	1	0	162 G a 261 G a 263 G c			R		R	R	R	R	R		
5	1	10	0	0	1	0	308 G a					R						
6	1	10	0	0	1	0	63 G a					R		R				
7	1	10	0	0	1	0	291 G a		R	R		R						
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>%</b>	<b>100</b>		<b>30</b>	<b>0</b>	<b>70</b>	<b>0</b>		<b>10</b>	<b>10</b>	<b>70</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
AN: Amikacina, GEN: Getamicina, AM: Ampicilina, ATM: Aztreonam, CFZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, AMC: Amoxicilina/Clavulánico, CIP: Ciprofloxacina, LVX: Levofloxacina y SXT: Trimetoprim/Sulfametoxazol. Ninguna de las cepas fueron resistentes a IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, TZP: Piperacilina/Tazobactam y C: Colistina.																		
B, P, R, Pa: nº de cepas de broilers, ponedoras, reproductoras y pavos de engorde																		
R= Resistente I=Intermedio según las normas NCCLS/CLSI, 2014																		

#### 4.2.3 *Genes de virulencia*

Las diez cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 fueron investigadas por PCR para la presencia de 35 genes que codifican para factores de virulencia típicos de cepas de *E. coli* causantes de infecciones extraintestinales en aves y seres humanos.

De los 35 genes de virulencia analizados, once fueron detectados en todas las cepas: *fimH*, *yfcV*, *hlyF*, *iroN*, *fyuA*, *chuA*, *kpsM* II-K1, *traT*, *ibeA*, *malX* y *usp*. Otros cuatro genes que también se detectaron muy frecuentemente fueron: *tsh* (80%), *iucD* (90%), *iutA* (90%), *cvaC* (70%), *iss* (90%) y *ompT* (90%) (Tabla 64).

Por lo tanto las 10 cepas presentaron un gran número de genes de virulencia: entre 13 y 18 genes, y con una media de 16,1 genes de virulencia por cepa. El perfil más prevalente fue: *fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM* II-K1 *cvaC iss traT ibeA malX usp ompT*.

Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos por Mora *et al.*, 2010, en lo que se refiere a los patrones de genes de virulencia y a que la mayoría de las cepas aviares O25b:H4-B2-ST131 poseen el estatus ExPEC. Concretamente, nueve de las 10 cepas aviares fecales de este grupo clonal de alto riesgo presentaron los estatus ExPEC, NMEC y APEC, y las 10 el estatus UPEC. Por lo tanto atendiendo a sus genes de virulencia podrían causar infecciones urinarias, septicemias y meningitis en seres humanos y ser patógenas también para aves.

Tabla 64. Prevalencias de genes ExPEC en el grupo clonal ST131 en broilers (B) y gallinas reproductoras (R).

Genes	Nº y origen de las cepas		
	B	%	Total %
<b>Adhesinas</b>			
<i>fimH</i>	3	100,0	10 100,0
<i>yfcV</i>	3	100,0	10 100,0
<b>Toxinas</b>			
<i>tsh</i>	3	100,0	8 80,0
<i>hlyF</i>	3	100,0	10 100,0
<b>Sideróforos</b>			
<i>iucD</i>	3	100,0	9 90,0
<i>iutA</i>	3	100,0	9 90,0
<i>iroN</i>	3	100,0	10 100,0
<i>fyuA</i>	3	100,0	10 100,0
<i>chuA</i>	3	100,0	10 100,0
<b>Cápsula</b>			
<i>Kpsm II-K1</i>	3	100,0	10 100,0
<b>Varios</b>			
<i>cvaC</i>	1	33,3	7 70,0
<i>iss</i>	6	200,0	9 90,0
<i>traT</i>	3	100,0	10 100,0
<i>ibeA</i>	3	100,0	10 100,0
<i>malX</i>	3	100,0	10 100,0
<i>usp</i>	3	100,0	10 100,0
<i>ompT</i>	3	100,0	9 90,0

#### 4.2.4 Clonotipos y virotipos: Comparación entre cepas aviarias y humanas

El clonotipado de las diez cepas aviarias O25b:H4-B2-ST131 reveló que todas pertenecían al CH40-22. Este clonotipo es el segundo más frecuente entre cepas ST131 humanas y es el que previamente se había encontrado en casi todas las cepas ST131 aisladas tanto de las heces de gallinas como de carne de pollo en los estudios previos realizados en el LREC-USC (Mora *et al.*, 2010; Herrera, 2015).

En contraste, ninguna de las cepas de este estudio presentó el clonotipo CH40-30, que es el predominante entre cepas ST131 tanto BLEEs como no BLEEs causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos en Galicia, en otras partes de España y a nivel mundial (Blanco *et al.*, 2013; Dahbi *et al.*, 2014; Mathers *et al.*, 2015).

Según el esquema de virotipos para el grupo clonal ST131, desarrollado por Dahbi *et al.* (2014) las diez cepas aviarias fecales O25b:H4-B2-ST131 de este estudio poseen el virotipo D4 (100%) ya que presentan los genes de virulencia *iroN*, *ibeA* y *neuC-K1*. El virotipo D4 también es el mayoritario entre las cepas O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22 aisladas de seres humanos (Mamani, 2014).

En la Tabla 65 se comparan las características de las 10 cepas aviarias fecales O25b:H4-B2-ST131 de esta tesis con tres cepas bacteriémicas humanas de *E. coli* productoras de BLEE O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22. Seis de las cepas aviarias presentaron el mismo perfil de genes de virulencia que dos de las cepas humanas (H3044 y H3345), y las otras cuatro cepas aviarias un perfil de genes de virulencia muy similar.



Tabla 65. Comparación entre cepas aviarias fecales y humanas bacteriémicas de *E. coli* ST131.

CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
FV19219-63 G a	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
FV19241-162 G a	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
FV19264-261 G a	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II- K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	16	ExPEC UPEC NMEC APEC
FV19271-263 G c	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
FV19276-289 G c	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp ompT</i>	16	ExPEC UPEC NMEC APEC
FV19278-291 G a	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 iss traT ibeA malX usp</i>	14	ExPEC UPEC NMEC APEC



CEPAS	FILOGRUPO <i>Clermont et al., 2000/2013</i>	CLONOTIPO	ST	SEROTIPO	TIPADO BLEE	PERFIL VIRULENCIA	Nº DE GENES	ESTATUS
<b>FV19279-305 G a</b>	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV hlyF iroN fyuA chuA kpsM II- K1 cvaC traT ibeA malX usp ompT</i>	13	UPEC
<b>FV19280-308 G a</b>	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>FV19295-375 G b</b>	B2/B2	CH40-22	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>FV19301-417 G b</b>	B2/B2	B2-3	ST131	O25b:H4		<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H2262</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	CTX-M-9	<i>fimH papC papAH papEF papGIII yfcV cdtB hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K5 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	21	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H3044</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	CTX-M-9	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC
<b>H3345</b>	B2	CH40-22	ST131	O25b:H4	SHV-12	<i>fimH yfcV tsh hlyF iucD iutA iroN fyuA chuA kpsM II-K1 cvaC iss traT ibeA malX usp ompT</i>	17	ExPEC UPEC NMEC APEC

#### 4.2.5 *Perfiles de macrorrestricción*

En la Figura 40 aparecen los perfiles de PFGE de 54 cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22 y del virotipo D4 aisladas en España:

- Las 10 cepas fecales aviares del presente estudio.
- Nueve cepas causantes de infecciones extraintestinales (bacteriemias e ITUs) en seres humanos.
- Dos cepas causantes de colibacilosis en pollos.
- 28 cepas aisladas de carne de pollo.
- Cuatro cepas aisladas de carne de cerdo.
- Una cepa aislada de carne de vacuno.

Destacar que cinco de las cepas fecales aviares aisladas en este estudio se englobaron en un mismo cluster con dos cepas aisladas de carne de pollo en la ciudad de Lugo y con dos cepas bacteriémicas de pacientes del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA), presentando un 88% de identidad entre ellas. Además, dos de las cepas aviares fecales presentaron más de un 92% de identidad en sus perfiles de PFGE con las dos cepas bacteriémicas humanas y una de las cepas fecales aviares productora del enzima CMY-2 más de un 97% con una cepa bacteriémica humana también productora de CMY-2.

También es destacable que otras dos cepas aviares fecales CMY-2 positivas de este estudio formaron otro cluster con más de un 87% de identidad con cuatro cepas productoras de CMY-2 aisladas de carne de pollo en la ciudad de Lugo (Herrera,

2015). Dándose la circunstancia que una de las cepas aviarias fecales presentó un 94,7% de identidad con una cepa aislada de carne de pollo.

Además, otra cepa fecal aviar de esta tesis formó un cluster con otras 11 cepas aisladas de carne de pollo y con una cepa aislada de carne de porcino obtenida en la ciudad de Lugo, encontrándose más de un 95% de identidad con seis de dichas cepas. Las 12 cepas de este cluster no eran productoras de BLEE ni CMY-2.

Estos resultados indican claramente que las cepas aviarias del grupo clonal de alto riesgo ST131 productoras de la enzima CMY-2 pueden ser transmitidas por lo alimentos.

Los resultados de este estudio coinciden con los de la Tesis Doctoral de Herrera (2015) en la que también observaron que algunas de las cepas de *E. coli* O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22 y del virotipo D4 aisladas de carne de pollo poseían perfiles de PFGE muy similares (> 90% de identidad) a los encontrados en cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos.

Después de realizar la secuenciación del genoma completo de nueve cepas aviarias (siete de carne de pollo y dos de colibacilosis) y de cinco cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22 productoras de la enzima CTX-M-9 comprobamos que su genoma presentaba una identidad muy elevada, presentando cuatro cepas aviarias menos de 10 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) de diferencia con respecto a cuatro cepas humanas. En contraste, entre las cepas ST131 aviarias del clonotipo CH40-22 y las humanas del clonotipo CH40-30 existen aproximadamente 4900 SNPs de diferencia (Mora *et al.*, datos del LREC-USC no publicados).

En futuros estudios sería también muy interesante secuenciar el genoma completo de las cepas aviares fecales y aisladas de carne de pollo productoras de CMY-2 y compararlo con el de cepas O25b:H4-B2-ST131 del clonotipo CH40-22 productoras CMY-2 causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos.



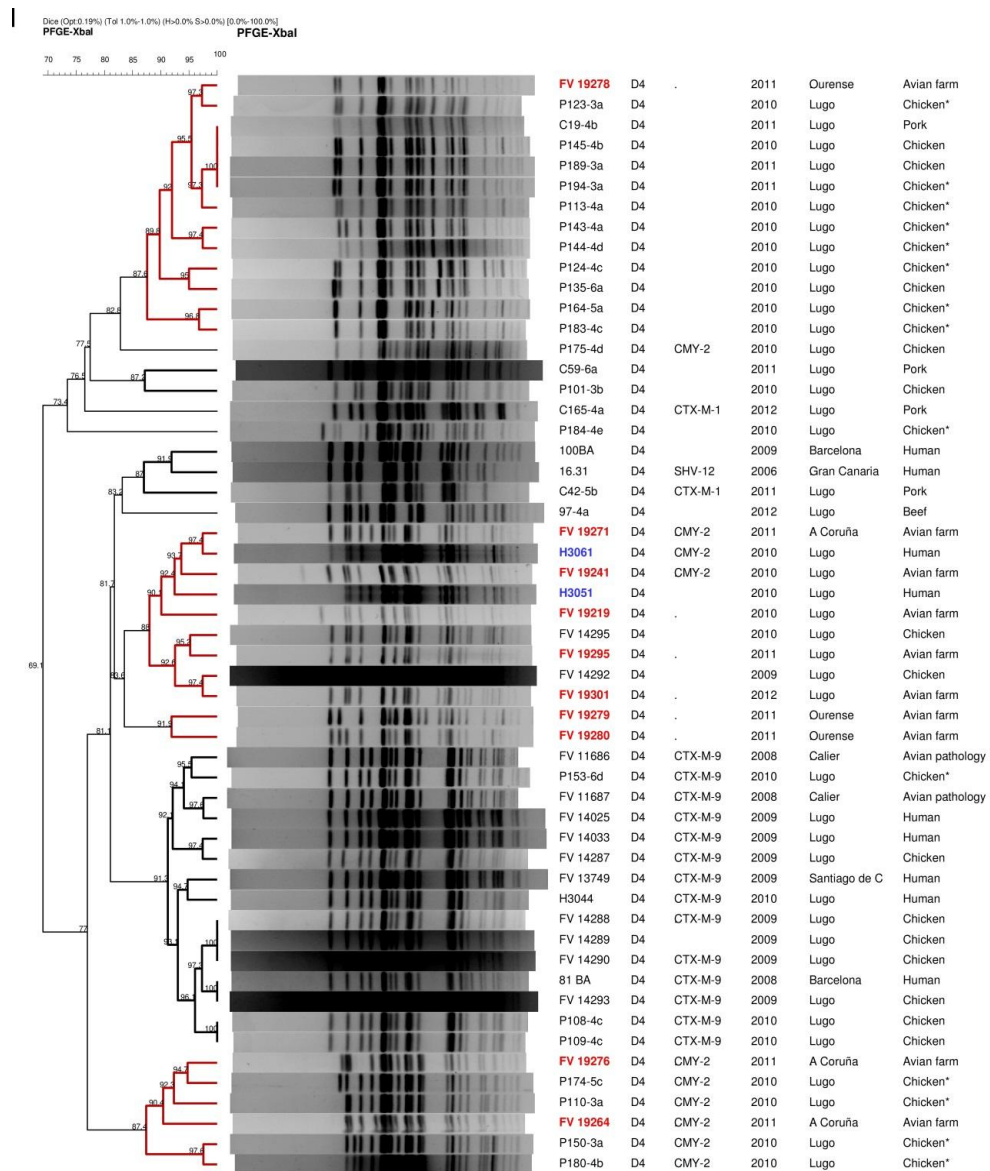


Figura 40. Dendrograma de los perfiles de PFGE de 54 cepas O25b:H4-B2-ST131. A la derecha del dendrograma figuran los códigos de las cepas (en rojo las 10 cepas ST131 aviarias fecales del presente estudio), el virotipo, los tipos de BLEE y AmpC, el año de aislamiento, la localidad y el origen de cepa (chicken: aislados de carne de pollo y con asterisco se indican las carnes envasadas en atmósfera modificada). Las cepas P175-4d, P174-5c, P110-3a, P150-3a y P180-4b son CMY-2+.

### 4.3 Comparación con estudios de otros países

Overdeest *et al.* (2011) después de determinar el tipo de enzima BLEE y la secuencias tipo de 158 cepas de *E. coli* aisladas de carne de pollo, de hisopos rectales de pacientes y de hemocultivos de pacientes en el año 2009 en Holanda, observaron que las cepas de origen aviar (AV) eran muy similares a las cepas aisladas del contenido intestinal (HI) de los pacientes y las cepas bacteriémicas (HB). La enzima predominante entre las cepas aisladas de carne de pollo y de los hisopos rectales de los pacientes fue la CTX-M-1 (58,1% y 45,8% respectivamente). En contraste entre las cepas bacteriémicas predominaba CTX-M-14 (33,3%), pero el 20,8% eran productoras de CTX-M-1. Aunque encontraron una amplia variedad de secuencias tipo entre las 158 cepas analizadas, las más frecuentes fueron las siguientes: ST10 (AV, HB, HI), ST23 (AV, HB, HI), ST38 (AV, HB, HI), ST46 (HB), ST117 (AV, HI), ST131 (HB, HI), ST155 (AV), ST156 (AV, HI), ST168 (AV, HI), ST350 (AV). También en esta tesis hemos encontrado que la enzima CTX-M-1 fue la predominante entre las cepas fecales aviares de Galicia y también encontramos en las explotaciones avícolas gallegas cepas productoras de BLEE con las secuencias ST10, ST38, ST117, ST155, ST156 y ST350.

Resultados similares fueron obtenidos por Leverstein-van Hall *et al.* (2011) también en Holanda y en el año 2009. El 35% de las cepas clínicas humanas contenían genes BLEE asociados con las cepas aviares y el 19% genes BLEE localizados en plásmidos Incl I que eran indistinguibles genéticamente de aquellos encontrados en cepas aviares. Además, las cepas humanas productoras de CTX-M-1 poseían secuencias tipo (ST57, ST117, ST354) encontradas en cepas aisladas de carne y

heces de pollos. Además, el 39% de las cepas CTX-M-1, TEM-52 y SHV-12 aisladas de carne de pollo presentaron secuencias tipo encontradas entre las cepas clínicas humanas (ST10, ST23, ST57, ST117, ST354). Tres de estas secuencias (ST10, ST57, ST117) también fueron encontradas entre las cepas fecales aviares en esta tesis doctoral.

En contraste, con los dos anteriores estudios realizados en Holanda por Overdevest *et al.* (2014) y Leverstein-van Hall *et al.* (2011), Börjesson *et al.* (2016) en Suecia, después de caracterizar 716 cepas de *E. coli* productoras de BLEE y/o pAmpC aisladas de seres humanos, de granjas y carne (pollos, vacuno y porcino), llegan a la conclusión que no hay evidencias de la clonal expansión de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y/o pAmpC desde las granjas de animales o de los alimentos a los seres humanos. No obstante, identifican a las explotaciones avícolas y a la carne de pollo como un reservorio y una ruta de diseminación a seres humanos de cepas de *E. coli* productoras de BLEE y/o AmpC que poseen genes y plásmidos de resistencia idénticos, pero califican dicha diseminación de limitada. Los genes *bla*<sub>CMY-2</sub> y *bla*<sub>CTX-M-1</sub> fueron los únicos encontrados en todos los tipos de muestras analizadas y los únicos encontrados en las explotaciones avícolas y en carne de pollo. Los dos genes más ampliamente encontrados en las cepas aisladas de seres humanos (*bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-14</sub>) no se detectaron en las cepas aisladas de pollos criados en Suecia y carne de pollos criados en dicho país, pero si en carne de pollo importada. Cuando se analizaron conjuntamente las secuencias tipo de las cepas, el tipo de replicón de los plásmidos y los genes BLEE y pAmpC, únicamente 17 (2%) de las 715 cepas analizadas presentaron tres combinaciones solapadas: ST155-incI1-*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, ST10-incI1-*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, ST57-incK-*bla*<sub>CMY-2</sub>. Estos resultados están en la línea de los encontrados en la presente tesis doctoral y difieren significativamente con los encontrados en los estudios realizados en Holanda por Overdevest *et al.* (2014) y

Leverstein-van Hall *et al.* (2011). En el estudio sueco entre las cepas *E. coli* productoras de BLEE y/o pAmpC se observaron 15 de las secuencias tipo (ST10, ST38, ST48, ST57, ST88, ST117, ST131, ST135, ST155, ST162, ST297, ST533, ST602, ST744 y ST1304) encontradas entre las cepas aviares fecales productoras de BLEE o CMY-2 de esta tesis doctoral.

Por su parte Day *et al.* (2016) determinaron las secuencias tipo, el tipo de enzima BLEE y los plásmidos que llevaban los genes BLEE de 353 cepas de *E. coli* aisladas de seres humanos, animales y de carne en Alemania, Holanda y el Reino Unido entre los años 2005 y 2009. Identificaron 158 diferentes STs. Las 10 secuencias tipo más prevalentes fueron por orden de frecuencia: ST131, ST10, ST88, ST405, ST117, ST58, ST69, ST38, ST665 y ST156; representando el 43,9% de las cepas y ocho de estas secuencias tipo se encontraron tanto en cepas de origen humano como animal. La ST405 únicamente se encontró en humanos y la ST665 solamente en aves. El 44,0% de las cepas humanas pertenecían a cuatro secuencias tipo (ST131, ST405, ST10 y ST38) comparado con el 34,9% de las bovinas que pertenecía a tres (ST88, ST69 y ST10) y solamente el 19,7% de las aviares (ST10, ST88 y ST665). La secuencia tipo más prevalente fue la ST131, siendo 40 de las 43 cepas de origen humano y dos de carne de pollo y una fecal aviar. Las otras dos secuencias tipo más prevalentes fueron la ST10 (26 cepas) y la ST88 (23 cepas), y se aislaron en los tres países y de una amplia variedad de orígenes. Mientras que cepas con estas dos secuencias circularían entre animales y humanos, las cepas ST131, ST405 y ST38 se asocian especialmente con las de origen humano. El gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> resultó ser el gen BLEE más prevalente en las cepas de origen aviar de los tres países, mientras que en las cepas de origen humano el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> resultó ser el más prevalente en los tres países representando el 50% de las cepas. Sin embargo el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> era mucho



más prevalente entre las cepas de origen humano en Holanda (28,8%) y Alemania (35,7%) que en el Reino Unido (3,7%). También entre las cepas aviares fecales de esta tesis el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> resulto ser el más prevalente (39,2%) y el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> entre las bacteriémicas humanas (41,7%) del Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA). Y como en el Reino Unido las cepas con el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> están poco representadas entre las bacteriémicas humanas (8,3%) de pacientes del HULA. Entre las cepas fecales aviares de *E. coli* productoras de BLEE de esta tesis nosotros identificamos cinco (ST10, ST88, ST117, ST38 y ST156) de las 10 secuencias tipo más prevalentes en estos tres países y entre las bacteriémicas de pacientes del HULA identificamos siete de dichas secuencias (ST131, ST10, ST88, ST405, ST58, ST69 y ST156). Al analizar los plásmidos Day *et al.* (2016) comprobaron que los del tipo Inc1-1 $\gamma$  que llevaban el gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> eran comunes entre las cepas de origen humano y animal, mientras que los plásmidos IncF *bla*<sub>CTX-M-15</sub> estaban presentes casi exclusivamente en las cepas de origen humano. Concluyen que hay una transmisión potencial de plásmidos con genes BLEE entre humanos y animales pudiendo ser los alimentos de origen animal fuentes importantes de transmisión de cepas con plásmidos del tipo Inc1-1 $\gamma$  *bla*<sub>CTX-M-1</sub>.

Maluta *et al.* (2014) comparó las secuencias tipo, los serogrupos y los genes de virulencia de cepas de *E. coli* causantes de colibacilosis en aves (n = 76) con cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos (n= 53) aisladas en Brasil, observando numerosos solapamientos. Nueve serogrupos (O2, O6, O7, O8, O11, O19, O25, O73 y O153) y secuencias tipo (ST10, ST88, ST93, ST117, ST131, ST155, ST359, ST648 y ST1011) se encontraron tanto en las cepas humanas como en las aviares. En esta tesis entre las cepas aviares fecales de *E. coli* productoras de BLEE o CMY-2 encontramos ocho (ST10, ST88, ST93, ST117, ST131, ST155, ST359, ST648) de estas nueve secuencias tipo y seis entre las bacteriémicas humanas

(ST10, ST88, ST93, ST131, ST359, ST648). No obstante, cuando los investigadores brasileños compararon los genes de virulencia de las cepas causantes de colibacilosis en aves con las responsables de infecciones extraintestinales en seres humanos, comprobaron que los genes usualmente encontrados en plásmidos Col V (*tsh*, *iucA*, *iss* y *hlyF*) se asociaban con las cepas de origen aviar mientras que los genes *fyuA*, *irp2*, *fepC*, *sitD*, *fimH*, *crl*, *csgA*, *afa*, *iha*, *sat*, *hlyA*, *hra*, *cnf1*, *kpsMTII*, *clpV* y *malX* se encontraban asociados con las cepas humanas. Atendiendo a los patrones de genes de virulencia las cepas se englobaron en dos grandes clusters (A y B). Aunque ambos clustes contenían cepas de origen humano y aviar, la mayoría de las cepas humanas (71,7%) se englobaban en el cluster A, mientras que la mayoría de las aviares (63,2%) se englobaron en el cluster B. En esta tesis doctoral hemos encontrado resultados similares ya los genes de virulencia *hlyF*, *iroN*, *cvaC*, *iss* y *traT* se asociaron estadísticamente a las cepas aviares, mientras que con las cepas bacteriémicas humanas se asociaron los genes *papAH*, *papEF*, *afa/draBC*, *afaFM9554589*, *yfcV*, *sat*, *hlyA*, *iucD*, *iutA*, *iroN*, *fyuA*, *chuA*, *kpsM II* (K2 y K5), *malX*, *usp* y *ompT*.

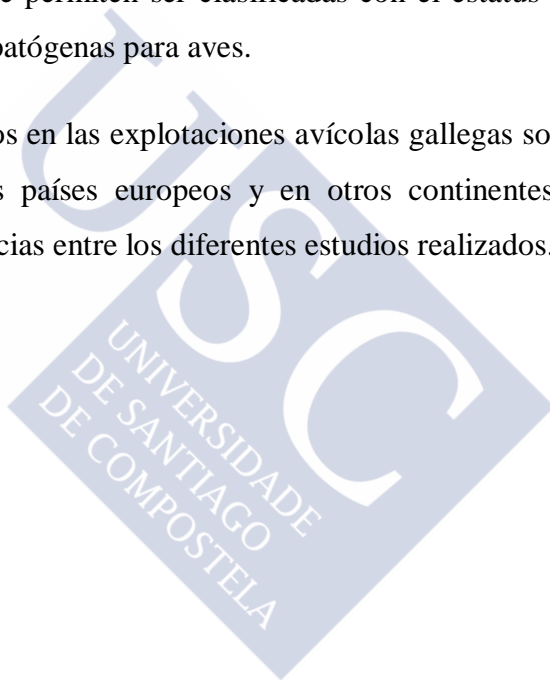


## 5 CONCLUSIONES

1. En las explotaciones avícolas de Galicia hay una prevalencia elevada de cepas de *E. coli* productoras de BLEE, siendo especialmente prevalentes en las explotaciones de broilers.
2. La mayoría de las cepas aviares fecales producen las enzimas CTX-M-1, CTX-M-14 y SHV-12.
3. Las cepas aviares productoras de BLEE son multirresistentes y casi la mitad son resistentes a las quinolonas fluoradas.
4. Existe una enorme diversidad genética entre las cepas aviares productoras de BLEE, ya que pertenecen a una amplísima variedad de serotipos, clonotipos y secuencias tipo.
5. Aunque las cepas aviares productoras de BLEE pueden pertenecer a los siete grupos filogenéticos reconocidos, más de la mitad se engloban en el A y en B1.
6. Un porcentaje significativo de las cepas aviares fecales productoras de BLEE presentan clonotipos, secuencias tipo y perfiles de genes de virulencia similares a los encontrados en cepas productoras de BLEE causantes de bacteriemias en seres humanos.
7. Las aves son un reservorio de cepas del subclón CH40-22 y del virotipo D4 del grupo clonal O25b:H4-B2-ST131. Además, algunas cepas aviares de este subclón

son muy similares a las cepas de dicho subclón causantes de infecciones extraintestinales (bacteriemias e ITUs) en seres humanos.

8. En contraste las aves no son un reservorio del subclón CH40-30 que es el más exitoso y expandido entre las cepas causantes de infecciones extraintestinales en seres humanos a nivel mundial.
9. Muchas de las cepas fecales aviarias de *E. coli* productoras de BLEE poseen genes de virulencia que le permiten ser clasificadas con el estatus APEC y por tanto ser potencialmente patógenas para aves.
10. Los resultados encontrados en las explotaciones avícolas gallegas son similares a los encontrados en otros países europeos y en otros continentes, aunque se observan notables diferencias entre los diferentes estudios realizados.



## 6 BIBLIOGRAFÍA

### 6.1 *Bibliografía general*

**Abreu R**, Castro-Hernández B, Madueño A, Espigares-Rodríguez E, Moreno-Roldán E, Moreno P, Sánchez-Tudela JM, Arias A. 2013. Prevalence of *Escherichia coli* strains producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL) from chickens in Tenerife (Spain) poultry farms. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 13(4): 1091-1096.

**Aidar-Ugrinovich L**, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma DL, Silveira WD, Pestana de Castro AF. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3): 297-306.

**Al-Bayssari C**, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. 2015. Detection of expanded-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria in the 21<sup>st</sup> century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 1-20.

**Albrechtova K**, Dolejska M, Cizek A, Tausova D, Klimes J, Beborá L, Literak I. 2012. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are

reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(7): 4013-4017.

**Allen HK**, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4): 251-259.

**Alvarez J**. 2011. Presente y futuro de la avicultura gallega. XLVIII Simposio Científico de Avicultura. Santiago de Compostela 5-7 octubre de 2011.

**Ambler RP**. 1980. The Structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036): 321-331.

**Anastasi EM**, Matthews B, Gundogdu A, Vollmerhausen TL, Ramos NL, Stratton H, Ahmed W, Katouli M. 2010. Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants.

Applied and Environmental Microbiology, 76(17): 5882-5886.

**Andreu A.** 2005. Patogenia de las infecciones del tracto urinario. Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica, 23(4): 15-21.

**Báez J,** Hernández-García M, Guamparito C, Díaz S, Olave A, Guerrero K, Cantón R, Baquero F, Gahona J, Valenzuela N, Del Campo R, Silva J. 2015. Molecular characterization and genetic diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* colonizing the migratory Franklin's gulls (*Leucophaeus pipixcan*) in Antofagasta, North of Chile. Microbial Drug Resistance, 21(1): 111-116.

**Barnes HJ,** Nolan LK, Vaillancourt JP. 2008. Colibacillosis. In: Diseases of poultry. Editor: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR *et al.* Blackwell Publishing, Iowa, USA: 691-737.

**Batista LA,** Bergiante G, Lapa J, Vieira DV, Picão RC, Meurer B, Bonelli RR. 2015. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 110(2): 249-254.

**Bauer RJ,** Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H, Marrs CF. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN* *E. coli*. Journal of Infectious Diseases, 185(10): 1521-1524.

**Bélanger L,** Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois CM. 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human

extraintestinal pathogenic *E. coli*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 62(1): 1-10.

**Ben Sallem R,** Ben Slama K, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, Boudabous A, Torres C. 2012. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-and CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from healthy food-producing animals in Tunisia. Foodborne Pathogens and Disease, 9(12):1137-1142.

**Bettelheim KA.** 2007. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. Critical Reviews in Microbiology, 33(1): 67-87.

**Beutin L.** 2006. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 53(7): 299-305.

**Bidet P,** Mahjoub-Messai F, Blanco J, Blanco J, Dehem M, Aujard Y, Bingen E, Bonacorsi S. 2007. Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. Journal of Infectious Diseases, 196(2): 297-303.

**Blaak H,** Hamidjaja RA, van Hoek AHAM, de Heer L, de Roda Husman AM, Schets FM. 2014. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. Applied and Environmental Microbiology, 80(1): 239-246.

**Blaak H,** van Hoek AHAM, Hamidjaja RA, van der Plaats RQJ, Kerkhof-de Heer L, de Roda

Husman AM, Schets FM. 2015. Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. PLoS ONE 10(8): e0135402, 1-23.

**Blanc V**, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, Navarro F, Cortés P, Llagostera M. 2006. ESBL- and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. Veterinary Microbiology, 118: 299-304.

**Blanco J**, Alonso MP, Blanco M, González EA. 1991. Mecanismos de patogénesis de *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 9(10): 640-651.

**Blanco J**, Blanco M, Alonso MP, Blanco JE, Garabal JI, González EA. 1992a. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. FEMS Microbiology Letters, 96(2-3): 155-159.

**Blanco J**, Blanco M, Alonso MP, Garabal JI, Blanco JE, González EA. 1992b. Factores de virulencia de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Lugo, Monografía nº 170, Servicio de Publicaciones de Intercambio Científico. Universidade de Santiago de Compostela.

**Blanco J**, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Garabal JI, González EA. 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico

microbiológico. Servicio de Publicaciones de la Diputación Provincial de Lugo.

**Blanco J**, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. 2002. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: Manual de Microbiología Veterinaria. Editores: Vadillo S, Píriz S & Mateos E. McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 301-325.

**Blanco J**, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, Herrera A, Marzoa J, Fernández V, de la Cruz F, Martínez-Martínez L, Alonso MP, Nicolas-Chanoine MH, Johnson JR, Johnston B, López-Cerero L, Pascual A, Rodríguez-Baño J, the Spanish Group for Nosocomial Infections (GEIH). 2013. Four main virotypes among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. Journal of Clinical Microbiology, 51(10): 3358-3367.

**Blanco JE**, Blanco M, Blanco J, Mora A, Balaguer L, Mourinho M, Juárez A, Jansen WH. 1996. O serogroups, biotypes and eae genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. Journal of Clinical Microbiology, 34(12): 3101-3107.

**Blanco JE**, Blanco M, Mora A, Blanco J. 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy



chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2953-2957.

**Blanco JE**, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dhabi G, Coira MA, Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo (Spain) from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1): 311-319.

**Blanco M**, Blanco J, Blanco JE, Ramos J. 1993. Enterotoxigenic, verotoxigenic and necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *American Journal of Veterinary Research*, 54(9): 1446-1451.

**Blanco M**, Blanco JE, Mora A, Dhabi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. 2004. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain: identification of a new intimin variant gene (eae-ξ). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2): 645-651.

**Bonnedahl J**, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernández J, Granholm S, Kayser Y, Melhus Å, Kahlmeter G, Waldenström J, Johansson A, Olsen B. 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PloS One*, 4(6): e5958, 1-6.

**Bonnedahl J**, Drobni P, Johansson A, Hernández J, Melhus Å, Stedt J, Olsen B, Drobni M. 2010. Characterization, and comparison, of human clinical and black-headed gull (*Larus ridibundus*) extended-spectrum β-lactamase-producing bacterial isolates from Kalmar, on the southeast coast of

Sweden. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9): 1939-44.

**Bonnedahl J**, Hernández J, Stedt J, Waldenström J, Olsen B, Drobni M. 2014. Extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in gulls, Alaska, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 20(5): 897-899.

**Bonnet C**, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS. 2009. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22): 6955-6962.

**Börjesson S**, Ny S, Egervärn M, Bergström J, Rosengren Å, Englund S, Löfmark S, Byfors S. 2016. Limited Dissemination of Extended-Spectrum β-Lactamase- and Plasmid-Encoded AmpC-Producing *Escherichia coli* from Food and Farm Animals, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*, 22(4): 634-640.

**Bortolaia V**, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM. 2010. High diversity of extended-spectrum β-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(4): 1623-1626.

**Bortolaia V**, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L. 2011. Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from healthy poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16): 5830-5833.

- Briñas L**, Moreno MA, Zarazaga M, Porrero C, Sáenz Y, García M, Dominguez L, Torres C. 2003. Detection of CMY-2, CTX-M-14 and SHV-12 beta-lactamases in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from healthy chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(6): 2056-2058.
- Briñas L**, Moreno MA, Teshager T, Sáenz Y, Porrero C, Dominguez L, Torres C. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3): 1262-1264.
- Brisse S**, Diancourt L, Laouénan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, Drieux L, Leflon-Guibout V, Mentré F, Jarlier V, Nicolas-Chanoine MH. 2012. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non - extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9): 2974-81.
- Bush K**. 1989. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3): 259-263.
- Bush K**, Jacoby GA, Medeiros A. 1995. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6): 1211-1233.
- Bush K**, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3): 969-76.
- Calvo J**, Cantón R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. SEIMC: 1-34.
- Cantón R**, Coque TM. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5): 466-475.
- Cantón R**, Gonzáles-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in Microbiology*, 3(110): 1-19.
- Carmo LP**, Nielsen LR, da Costa PM, Alban L. 2014. Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infection Ecology and Epidemiology*, 5(4): 22924.
- Cerisuelo A**, Marín C, Sánchez-Vizcaíno F, Gómez EA, de la Fuente JM, Durán R, Fernández C. 2014. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. *Poultry Science*, 93(3): 599-606.
- Chattaway MA**, Harris R, Jenkins C, Tam C, Coia JE, Gray J, Iturriza-Gomara M, Wain J. 2013.

Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. *Euro Surveillance*, 18(37): 20582.

**Cid D**, Blanco M, Blanco JE, Ruíz Santa Quiteria JA, de la Fuente R, Blanco J. 1996. Serogroups, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic kids in Spain. *Veterinary Microbiology*, 53(3-4): 349-354.

**Clermont O**, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10): 4555-4558.

**Clermont O**, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G. 2008. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5):1024-1028.

**Clermont O**, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylotyping method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1): 58-65.

**Cohen MB**, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in acute childhood enteritis: A prospective controlled study. *Journal of Pediatrics*, 146(1): 54-61.

**Coira A**. 2008. B-lactamasas de espectro ampliado: Estudio comparativo del período 1989-1993 con la

situación actual. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Coque TM**, Novais A, Carattoli A, Poirer L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14(2): 195-200.

**Cortes P**, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, López C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(9): 2799-2805.

**Costa D**, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C. 2006. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6): 1311-1312.

**Croxen MA**, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4): 822-880.

**Dahbi G**, Mora A, Lopez C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, Coira A, Garcia-Garrote F, Pita JM, Velasco D, Herrera A, Viso S, Blanco JE, Blanco M, Blanco J. 2013. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* producing extended-

spectrum  $\beta$ -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(4): 347–351.

**Dahbi G**, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, Blanco M, Herrera A, Viso S, García-Garrote F, Tchesnokova V, Billig M, de la Cruz F, de Toro M, González-López JJ, Prats G, Chaves F, Martínez-Martínez L, López-Cerezo L, Denamur E, Blanco J. 2014. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16:H5-ST131: comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b:H4-ST131. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8): 1247-57.

**Dahms C**, Hübner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. 2015. Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PLoS ONE*, 10(11): e0143326, 1-13

**Daigle F**, Harel J, Fairbrother JM, Lebel P. 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(4): 286-291.

**Dantas G**, Sommer M. 2014. How to fight back against antibiotic resistance. *American Scientist*, 102: 42-51.

**Day MJ**, Rodríguez I, van Essen-Zandbergen A, Dierikx C, Kadlec K, Schink AK, Wu G, Chattaway MA, DoNascimento V, Wain J, Helmuth R, Guerra B, Schwarz S, Threlfall J, Woodward MJ, Coldham N, Mevius D, Woodford N. 2016. Diversity of STs, plasmids and ESBL

genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(5): 1178-1182.

**de Been M**, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJJ, Fluit AC, Bonten MJM, Willems RJL, de la Cruz F, van Schaik W. 2014. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *Plos Genetics*, 10(12): 1-17.

**de Rycke J**, González EA, Blanco J, Oswald E, Blanco M, Boivin R. 1990. Evidence for two types of cytotoxic necrotozing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(4): 694-699.

**Dho-Moulin M**, Fairbrother J. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30(2-3): 299-316.

**Dierikx CM**, van der Goot JA, Smith HE, Kant A, Mevius DJ. 2013. Presence of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production pyramid: a descriptive study. *PLoS One*, 8(11): e79005, 1-8.

**Dolejska M**, Biersova B, Kohoutova L, Literak I, Cizek A. 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6): 1941–1950.

**Dolejska M**, Matulova M, Kohoutova L, Literak I, Bardon J, Cizek A. 2011. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with *bla*<sub>SHV-12</sub> genes on IncFII plasmids. *Letters in Applied Microbiology*, 53: 271-277.

**Dozois CM**, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity*, 68(7): 4145-4154.

**Dutta S**, Guin S, Ghosh S, Pazhani GP, Rajendran K, Bhattacharya MK, Takeda Y, Nair GB, Ramamurthy T. 2013. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. *PloS one*, 8(2): e56068, 1-5.

**Dziva F**, Stevens MP. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4): 355-366.

**Egea P**, López-Cerero L, Navarro MD, Rodríguez-Baño J, Pascual A. 2011. Assessment of the presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in eggshells and ready-to-eat products. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(9): 1045-1047.

**Escherich T**. 1885. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. *Fortschritte der Medizin*, 3: 515-522.

**Escudero E**, Vinué L, Teshager T, Torres C, Moreno MA. 2009. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Research in Veterinary Science*, 88(1): 83-87.

**Estrada-García T**, Navarro-García F. 2012. Enteropathogenic *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 66(3): 281-298.

**Ewers C**, Li G, Wilking H, Kiessling S, Alt K, Antão EM, Latus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology*, 297(3): 163-76.

**Ewers C**, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH, Guenther S. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(4): 651-660.

**Ewers C**, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 2012. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 646-655.

**Ewing WH**. 1986. The genus *Escherichia*. In: *Identification of Enterobacteriaceae*, 4<sup>a</sup> edición

Editor: Edwards and Ewing's. Elsevier. Nueva York, 6: 93-134.

**Ferreira JC**, Penha Filho RAC, Andrade LN, Berchieri JA, Darini ALC. 2014. Detection of chromosomal bla<sub>CTX-M-2</sub> in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens. *Clinical Microbiology and Infection*, 20: 623–626.

**Fleming A**, 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. Influenzae*. Reproducido en Bulletin of the world Health Organization, 2001, 79(8): 780-790.

**Founou LL**, Founou RC, Essack SY. 2016. Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(1881): 1-19.

**Friese A**, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U. 2013. Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and ESBL/AmpC-producing *E. coli* from animal farms in Germany. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 126(3–4): 175–80.

**Garcia-Migura L**, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. 2014. Antimicrobial resistance of zoonotic and comensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 170: 1-9.

**Garmyn A**, Haesebrouck F, Hellebuyck T, Smet A, Pasmans F, Butaye P, Martel A. 2011. Presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in wild geese. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(7): 1643–1644.

**Geser N**, Stephan R, Hächler H. 2011. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, 8: 21-30.

**Ghunaim H**, Abu-Madi MA, Kariyawasam S. 2014. Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: potentials and limitations. *Veterinary Microbiology*, 172: 13-22.

**Gibert Perelló M**. 2010. Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fetal en gallinas ponedoras. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid.

**Gibson JS**, Cobbold RN, Trott DJ. 2010. Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal clinical infections in animals. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 592-598.

**Girlich D**, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P. 2007. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Applied*



and Environmental Microbiology, 73(14): 4681-4685.

**Giufre M**, Graziani C, Accogli M, Luzzi I, Busani L, Cerquetti M. 2012. *Escherichia coli* of human and avian origin: detection of clonal groups associated with fluoroquinolone and multidrug resistance in Italy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(4): 860-867.

**Golding GR**, Persaud N, Levett PN, McDonald RR, Irvine J, Nsungu M, Woods S, Khan M, Mataseje LF, Mulvey MR. 2012. Characterization of *Escherichia coli* urinary tract infection isolates in remote northern Saskatchewan communities : the Northern Antibiotic Resistance Partnership. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 74(3): 242-247.

**Gordon DM**, Cowling A. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. Microbiology-SGM, 149: 3575-3586.

**Guabiraba R**, Schouler C. 2015. Avian colibacillosis: still many black holes. FEMS Microbiology Letters, 362(15):1-8.

**Guenther S**, Grobbel M, Beutlich J, Bethe A, Friedrich ND, Goedecke A, Lübke-Becker A, Guerra B, Wieler LH, Ewers C. 2010a. CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* from wild birds in Germany. Environmental Microbiology Reports, 2(5): 641–645.

**Guenther S**, Grobbel M, Beutlich J, Guerra B, Ulrich RG, Wieler LH, Ewers C. 2010b. Detection of pandemic B2-O25-ST131 *Escherichia coli*

harbouring the CTX-M-9 extended-spectrum beta-lactamase type in a feral urban brown rat (*Rattus norvegicus*). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(3): 582–584.

**Guenther S**, Ewers C, Wieler LH. 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *E. coli* in Wildlife, yet Another Form of Environmental Pollution?. Frontiers in Microbiology, 2(246): 1-13.

**Guenther S**, Aschenbrenner K, Stamm I, Bethe A, Semmler T, Stubbe A, Stubbe M, Batsajkhan N, Glupczynski Y, Wieler LH, Ewers C. 2012. Comparable high rates of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in birds of prey from Germany and Mongolia. PLoS One. 7(12): e53039, 1-6.

**Guinée PAM**, Jansen WH, Wadström T, Sellwood R. 1981. *Escherichia coli* associated with neonatal diarrhoea in piglets and calves. In: Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig diarrhoea: Current Topics in Veterinary and Animal Science. Editor: Leeww PW, Guinée PAM, Martinus-Nijhoff, The Hague: 126-162.

**Gyles CL**. 2008. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. Animal Health Research Reviews, 9(2): 149-158.

**Gyles CL**, Fairbrother JM. 2010. *Escherichia coli*. In: Pathogenesis of bacterial infections in animals. Editor: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. Blackwell Publishing, Iowa, USA, 15: 267-308.

**Harada K**, Nakai Y, Kataoka Y. 2012. Mechanisms of resistance to cephalosporin and emergence of O25b-ST131 clone harboring CTX-

M-27  $\beta$ -lactamase in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from dogs and cats in Japan. *Microbiology and Immunology*, 56(7): 480–485.

**Hartl DL**, Dykhuizen DE. 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 18: 31–68.

**Hasan B**, Melhus A, Sandegren L, Alam M, Olsen B. 2014. The gull (*Chroicocephalus brunnicephalus*) as an Environmental bioindicator and reservoir for antibiotic resistance on the coastlines of the bay of Bengal. *Microbial Drug Resistance*, 20(5): 466–471.

**Hernandez J**, Bonnedahl J, Eliasson I, Wallensten A, Comstedt P, Johansson A, Granholm S, Melhus Å, Olsen B, Drobni M. 2010. Globally disseminated human pathogenic *Escherichia coli* of O25b-ST131 clone, harbouring *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, found in Glaucous-winged gull at remote Commander Islands, Russia. *Environmental Microbiology Reports*, 2(2): 329–332.

**Herrera A**. 2015. El papel de los alimentos en la transmisión de *Escherichia coli* potencialmente patógenas para el hombre: prevalencia y caracterización de cepas diarreagénicas y productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Ho PL**, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Yeung MK, Chan J, Chan PY, Yuen KY. 2011. Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to “critically

important” antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008–10. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(4): 765–768.

**Holland RE**. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(4): 345–375.

**Huerta B**. 2008. Aceites esenciales en el control de las patologías aviares, [http://www.wpsaaeca.es/aeca\\_imgs\\_docs/wpsa1177323612a.pdf](http://www.wpsaaeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1177323612a.pdf).

**Huijbers PM**, de Kraker M, Graat EA, van Hoek AH, van Santen MG, de Jong MC, van Duijkeren E, de Greeff SC. 2013. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in humans living in municipalities with high and low broiler density. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(6): 256–259.

**Huijbers PM**, Graat EA, Haenen AP, van Santen MG, van Essen-Zandbergen A, Mevius DJ, van Duijkeren E, van Hoek AH. 2014. Extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and people living and/or working on broiler farms: prevalence, risk factors and molecular characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10): 2669–2675.

**Jarlier V**, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. 1988. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases*, 10(4): 867–878.



- Javaloyas M**, García-Somoza D, Gudíol F. 2003. Bacteriemia por *Escherichia coli*: análisis epidemiológico y de la sensibilidad a los antibióticos en un hospital comarcal. *Medicina Clínica*, 120(4): 125-127.
- Jiang HX**, Tang D, Liu YH, Zhang XH, Zeng ZL, Xu L, Hawkey PM. 2012. Prevalence and characteristics of  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from farmed fish in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(10): 2350-2353.
- Johnson JR**. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1): 80-128.
- Johnson JR**, Stell AL. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1): 261-272.
- Johnson JR**, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Stell AL. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN* *E. coli*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity*, 68(5): 3040-3047.
- Johnson JR**, Murray AC, Gajewski A, Sullivan M, Snippes P, Kuskowski MA, Smith KE. 2003a. Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(7): 2161-2168.
- Johnson JR**, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. 2003b. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non urinary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5798-5802.
- Johnson JR**, O'Bryan TT. 2004. Detection of the *Escherichia coli* group 2 polysaccharide capsule synthesis gene *KpsM* by a rapid and specific PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1773-1776.
- Johnson JR**, Russo TA. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7):383-404.
- Johnson JR**, Clabots C, Kuskowski MA. 2008a. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12): 4078-4082.
- Johnson JR**, Johnston B, Clabots CR, Kuskowski MA, Roberts E, DebRoy C. 2008b. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2): 417-422.
- Johnson JR**, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. 2009a. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7): 2733-2739.

- Johnson JR**, Miller S, Johnston B, Clabots C, Debroy C. 2009b. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3721-3725.
- Johnson JR**, Nicolas-Chanoine MH, DebRoy C, Castanheira M, Robiscek A, Hansen G, Weissman S, Urban C, Platell J, Trott D, Zhanel G, Clabots C, Johnston BD, Kuskowski MA. 2012. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 18(4): 598-607.
- Johnson JR**, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV, Tchesnokova V. 2015a. Intensity and mechanisms of fluoroquinolone resistance within the H30 and H30-Rx subclones of *Escherichia coli* sequence type 131 compared with other fluoroquinolone-resistant *E. coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 59(8): 4471-4480.
- Johnson JR**, Porter S, Johnston B, Kuskowski MA, Spurbeck RR, Mobley HLT, Williamson DA. 2015b. Host characteristics and bacterial traits predict experimental virulence for *Escherichia coli* bloodstream isolates from patients with urosepsis. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(3): ofv083, doi: 10.1093/ofid/ofv083.
- Johnson TJ**, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, Kim KS, Spanjaard L, Nolan LK. 2008a. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(22): 7043-7050.
- Johnson TJ**, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. 2008b. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12): 3987-3996.
- Jones GL**, Warren RE, Skidmore SJ, Davies VA, Gibreel T, Upton M. 2008. Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(6): 1245-1251.
- Jouini A**, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C. 2007. Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5):1137-41.
- Kaper JB**, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 123-140.
- Kar D**, Bandyopadhyay S, Bhattacharyya D, Samanta I, Mahanti A, Nanda PK, Mondal B, Dandapat P, Das AK, Dutta TK, Bandyopadhyay S, Singh RK. 2015. Molecular and phylogenetic

characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. *Infection Genetic and Evolution*, 29: 82-90.

**Kauffmann F.** 1947. The serology of the coli group. *Journal of Immunology*, 57(1): 71-100.

**Kawamura K,** Goto K, Nakane K, Arakawa Y. 2014. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(2):104-110.

**Kilani H,** Abbassi MS, Ferjani S, Mansouri R, Sghaier S, Ben Salem R, Jaouani I, Douja G, Brahim S, Hammami S, Ben Chehida N, Boubaker IB. 2015. Occurrence of bla CTX-M-1, qnrB1 and virulence genes in avian ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from Tunisia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(38): 1-8.

**Kim KS.** 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(5): 376-385

**Kozak GK,** Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith RJ, Jardine C. 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3): 559–566.

**Krishan G,** Narang A. 2014. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 1(4): 156-162.

**Kruis W.** 2004. Review article: antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20(4): 75-78.

**Lahlaoui H,** Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M. 2014. Epidemiology of *enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(9): 400-404.

**Landman WJ,** Buter GJ, Dijkman R, van Eck JH. 2014. Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* colonies originating from outbreaks of *E. coli* peritonitis syndrome in chicken flocks. *Avian Pathology*, 43(4):345-356.

**Laube H,** Friese A, von Salviati C, Guerra B, Rösler U. 2014. Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4):519-527.

**Le Bouguenec C,** Archambaud M, Labigne A. 1992. Rapid and specific detection of the pap, afa, and sfa adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5): 1189-1193.

**Lee JH,** Chaudhari AA, Oh IG, Eo SK, Park SY, Jawale CV. 2015. Immune responses to oral vaccination with Salmonella-delivered avian pathogenic *Escherichia coli* antigens and protective efficacy against colibacillosis. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 79: 229-234.

**Leflon-Guibout V,** Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F, Heym B,

Bingen E, Nicolas-Chanoine MH. 2004. Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 3736-3742.

**Lefflon-Guibout V**, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. 2008. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12): 3900-3905.

**Leistner E**, Meyer P, Gastmeier Y, Pfeifer C, Eller P, Dem F, Schwab. 2013. Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive *Escherichia coli*. An exploratory case-control study. *PLoS ONE*, 8(9): e74323, 1-7.

**Lescat M**, Clermont O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D, Djossou F, Dupont C, Perroz G, Picard B, Catzefflis F, Andreumont A, Denamur E. 2012. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with hostdependant population structure. *Environmental Microbiology Report*, 5(1): 49-57.

**Leverstein-van Hall MA**, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ. 2011. Dutch patients, retail chicken

meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(6):873-80.

**Literak I**, Dolejska M, Radimersky T, Klimes J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H, Cizek A. 2009. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5): 1702-1711.

**Literak I**, Dolejska M, Janoszowska D, Hrusakova J, Meissner W, Rzycka H, Bzoma S, Cizek A. 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24): 8126-8134.

**Locatelli C**, Caronte I, Scaccabarozzi L, Migliavacca R, Pagani L, Moroni P. 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *E. coli* strains isolated from clinical bovine mastitis. *Veterinary Research Communication*, 33(1): 141-144.

**López-Cerero L**, Navarro MD, Bellido M, Martín-Pena A, Vinas L, Cisneros JM, Gomez-Langley SL, Sanchez-Monteseirin H, Morales I, Pascual A, Rodriguez-Bano J. 2013. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3): 809-814.

**Ma JY**, Zeng ZL, Chen ZL, Xu X, Wang X, Deng Y, Lü DH, Huang L, Zhang Y, Liu JH, Wang M. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2): 519-524.

**Machado E**, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. 2008. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 296-302.

**Magiorakos AP**, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3): 268-281.

**Mainil J**, Daube G. 2005. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who?. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (6): 1332-1344.

**Mainil JG**, Fairbrother JM. 2014. Pathogenic *Escherichia coli* in domestic mammals and birds. In: *Pathogenic Escherichia coli: Molecular and Cellular Microbiology*. Editor: Morabito S. Caister Academic Press, Norfolk, 2: 19– 43.

**Maluta RP**, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, Ramos MC, Nolan LK, da Silveira WD. 2014. Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. *PloS One*, 9(8): e105016, 1-11.

**Mamani RS**. 2014. Caracterización Molecular de Cepas de *Escherichia coli* del Grupo Clonal O25b: H4-B2-ST131 y de otros Clones Causantes de Infecciones Extraintestinales en Seres Humanos. Genes de Virulencia y de Resistencia. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.

**Manaia CM**, Vaz-Moreira I, Nunes OC. 2012. Antibiotic resistance in waste water and surface water and human health implications. In: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Editor: Barceló D. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 6: 173-212.

**Manges AR**, Johnson JR. 2012. Food-borne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clinical Infectious Diseases*, 55(5): 712-719.

**Manges AR**, Johnson JR. 2015. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 3(5):1-12.

**Marc D**, Dho-Moulin M. 1996. Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6): 444-452.

- Marrow J**, Whittington JK, Mitchell M, Hoyer LL, Maddox C. 2009. Prevalence and antibiotic-resistance characteristics of *Enterococcus* spp. isolated from free-living and captive raptors in central illinois. *Journal of Wildlife Diseases*. 45(2): 302-313.
- Mathers AJ**, Peirano G, Pitout JD. 2015. *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, 90: 109-154.
- Matsumura Y**, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S. 2012. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11): 2612–2620.
- Merino I**, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallarés MA, Gómez J, Xercavins M, Martínez-Martínez L, De Cueto M, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P on behalf of the ITUBRAS-GEIH-SEIMC group. 2016. CTX-M-15-*H30Rx*-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71: 2125-2130.
- Mitchell NM**, Johnson JR, Johnston B, Curtiss III R, Mellata M. 2015. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(3): 1177-1187.
- Moodley A**, Guardabassi L. 2009. Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4): 1709-1711.
- Mora A**. 2002. *Escherichia coli* verotoxigénicos (ECVT) O157:H7 y no O157. Prevalencia, serotipos, fagotipos, genes de virulencia, tipos de intiminas, perfiles de PFGE y resistencia a antibióticos de ECVT de origen humano y animal. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Mora A**, López C, Dabhi G, Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Herrera A, Mamani R, Bonacorsi S, Moulin-Schouleur M, Blanco J. 2009. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. *BMC Microbiology*, 9(1): 132.
- Mora A**, Herrera A, Mamani R, López C, Alonso MP, Blanco JE, Blanco M, Dahbi G, García-Garrote F, Pita JM, Coira A, Bernárdez MI, Blanco J. 2010. Recent emergence of clonal group O25b:K1:H4-B2-ST131 *ibeA* strains among *Escherichia coli* poultry isolates, including CTX-M-9 producing strains, and comparison with clinical human isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21): 6991-6997.
- Mora A**, Viso S, López C, Alonso MP, García-Garrote F, Dabhi G, Mamani R, Herrera A, Marzóa J, Blanco M, Blanco JE, Moulin-Schouleur M,



Schouler C, Blanco J. 2013. Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45:K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4): 506-512.

**Mora A**, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, Picard B, Blanco M, Alonso MP, Denamur E, Blanco J. 2014. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One*, 9(1): e87025, 1-9.

**Morales C**, Lee MD, Hofacre C, Maurer JJ. 2004. Detection of a novel virulence gene and a *Salmonella* virulence homologue among *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(3): 160-165.

**Moulin-Schouleur M**, Schouler C, Tailliez P, Kao MR, Brée A, Germon P, Oswald E, Mainil J, Blanco M, Blanco J. 2006. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10): 3484-3492.

**Moulin-Schouleur M**, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(10): 3366-3376.

**Muñoz C**, Porrero MC. 2016. Curso Resistencia a los antibióticos: cómo usarlos prudentemente.

Consejo General de Colegios Veterinarios de España. Módulo I, II y III.

**Murray PR**, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2006. Antibióticos. En: *Microbiología Médica*. Versión española de la 5ª edición de la obra en inglés: *Medical Microbiology*. Elsevier Mosby SA, Madrid, 20: 203-212.

**Naseer U**, Haldorsen B, Tofteland S, Hegstad K, Scheutz F, Simonsen GS, Sundsfjord A. 2009. Molecular characterization of CTX-M-15-producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug-resistant ST131 (O25:H4) and ST964 (O102:H6) strains in Norway. *APMIS, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 117(7):526-536.

**Nataro JP**, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1): 142-201.

**Navarro F**, Miró E. 2007. Entorno genético de las BLEE: implicaciones en la transmisión. Infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): un desafío epidemiológico y terapéutico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(2): 11-17.

**Nicolas-Chanoine MH**, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2):273-281.

- Nicolas-Chanoine MH**, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3): 543-574.
- Okeke IN**. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: status, uncertainties and necessities. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(11): 817-842.
- Olesen B**, Scheutz F, Menard M, Skov MN, Kolmos HJ, Kuskowski MA, Johnson JR. 2009. Threedecade epidemiological analysis of *Escherichia coli* O15:K52:H1. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6): 1857-1862.
- Oliver A**, Cantón R. 2003. Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas plasmídicas de espectro extendido. En: *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Boletín de Control de calidad SEIMC*. Disponible en: <http://www.seimc.org/control/index.asp>.
- Olsen RH**, Bisgaard M, Löhren U, Robineau R, Christensen H. 2014. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from poultry: a review of current problems, illustrated with some laboratory findings. *Avian Pathology*, 43(3): 199-208.
- Orskov F**, Orskov I. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods in Microbiology* Editor: Bergan T. Academic Press, Nueva York, 14: 43-112.
- Oteo J**, Navarro C, Cercenado E, Delgado-Iribarren A, Wilhelmi I, Orden B, García C, Miguelañez S, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Aracil B, Bautista V, Campos J. 2006. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7): 2359-2366.
- Oteo J**, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais Â, Pérez-Vázquez M, Moyá B, Miró E, Coque TM, Oliver A, Cantón R, Navarro F, Campos J, Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). 2009. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34: 173-176.
- Overdeest I**, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J. 2011. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerging Infection Diseases*, 17(7):1216-22.
- Pallett A**, Hand K. 2010. Complicated urinary tract infections: practical solutions for the treatment of multiresistant Gram-negative bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3): 25-33.
- Park YH**, Hwang SY, Hong MK, Kwon KH. 2012. Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Revue scientifique et technique, OIE*, 31(1):189-197.



**Parmley EJ**, Pinta, K, Majowicz S, Avery B, Cook A, Jokinen C, Gannon V, Lapen D R, Topp E, Edge TA, Gilmour M, Pollari F, Reid-Smith R, Irwin R. 2013. A Canadian application of one health: integration of *Salmonella* data from various Canadian surveillance programs (2005–2010). *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(9): 747-756.

**Peirano G**, Laupland KB, Gregson DB, Pitout JDD. 2011. Colonization of returning travelers with CTX-M-producing *Escherichia coli*. *Journal of Travel Medicine*, 18(5): 299–303.

**Pérez-Pérez FJ**, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6): 2153-2162.

**Pesapane R**, Ponder M, Alexander KA. 2013. Tracking pathogen transmission at the human-wildlife interface: banded mongoose and *Escherichia coli*. *Ecohealth*, 10(2): 115–128.

**Pinto L**, Radhouani H, Coelho C, Martins Da Costa P, Simoes R, Brandao RML, Torres C, Igrejas G, Poeta P. 2010. Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12): 4118–412.

**Poeta P**, Radhouani H, Igrejas G, Gonçalves A, Carvalho C, Rodrigues J, Vinué L, Somalo S, Torres C. 2008. Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23): 7439-7441.

**Poeta P**, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C, Igrejas G. 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*, 49(6): 584-588.

**Poeta P**, Radhouani H, Gonçalves A, Figueiredo N, Carvalho C, Rodrigues J, Igrejas G. 2010. Genetic characterization of antibiotic resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* carrying extended-spectrum beta-lactamases recovered from diarrhoeic rabbits. *Zoonoses Public Health*, 57(3): 162-170.

**Pomba C**, Da Fonseca JD, Baptista BC, Correia JD, Martinez-Martinez L. 2009. Detection of the pandemic O25-ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15-producing clone harboring the qnrB2 and aac(6')-Ib-cr genes in a dog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(1): 327–328.

**Radhouani H**, Pinto L, Coelho C, Goncalves A, Sargo R, Torres C, Igrejas G, Poeta P. 2010. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M classes in faecal samples of common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(1): 171–173.

**Randall LP**, Clouting C, Horton RA, Coldham NG, Wu G, Clifton-Hadley FA, Davies RH, Teale CJ. 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in

Great Britain between 2006 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 86–95.

**Rasheed JK**, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover FC. 1997. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(3): 647-653.

**Rasheed MU**, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, Jamil K. 2014. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 56(4):341-6.

**Reist M**, Geser N, Hächler H, Schärer S, Stephan R. 2013. ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: occurrence, risk factors for fecal carriage and strain traits in the Swiss slaughter cattle population younger than 2 years sampled at abattoir level. *PLoS ONE*, 8(8): e71725, 1-6.

**Rizzo L**, Manaia CM, Merlin C, Schwartz T, Dagot D, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *The Science of the total environment*, 447: 345–360.

**Rodrigues C**, Machado E, Pires J, Ramos H, Novais Â, Peixe L. 2015. Increase of widespread A, B1 and D *Escherichia coli* clones producing a high diversity of CTX-M-types in a Portuguese hospital. *Future Microbiology*, 10(7): 1125-1131.

**Rossolini GM**, D'Andrea MM, Mugnaioli C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(1): 33-41.

**Rubio P**. 2013. La microbiota intestinal en la salud aviar. Alternativas a los antibióticos. Jornadas Profesionales de Avicultura. León 28-31 de mayo 2013.

**Russo TA**, Johnson JR. 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases*, 181(5): 1753-1754.

**Sadeyen JR**, Kaiser P, Stevens MP, Dziva F. 2015. A cyclophosphamide-sensitive cell compartment is essential for homologous protection conferred by licensed vaccines for the control of avian pathogenic *Escherichia coli* in chickens. *Vaccine*, 33: 3624-3627.

**Saeed NM**. 2014. Detection of extended spectrum beta-lactamase gene production by *E. coli* isolated from human and broiler in Sulemania province/Iraq. *Journal of Zankoy Sulaimani*. 16(2):97-107.

**Saladin M**, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. 2002. Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2): 161-168.

- Sanguinetti M**, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B, Nicoletti G, Zanetti S, Fadda G. 2003. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4): 1463-1468.
- Schink AK**, Kadlec K, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S. 2013. Analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates collected in the GERM-Vet. monitoring programme. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8): 1741-1749.
- Schmid A**, Hormansdorfer S, Messelhauser U, Kasbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R. 2013. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* on bavarian dairy and beef cattle farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9):3027-3032.
- Schouler C**, Schaeffer B, Brée A, Mora A, Dahbi G, Biet F, Oswald E, Mainil J, Blanco J, Moulin-Schoule M. 2012. Diagnostic Strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*: 1673-1678.
- Seal BS**, Lillehoj HS, Donovan DM, Gay CG. 2013. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. *Animal Health Research Reviews*: 1-10.
- Silva N**, Igrejas G, Rodrigues P, Rodrigues T, Gonçalves A, Felgar AC, Pacheco R, Gonçalves D, Cunha R, Poeta P. 2011. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology*, 40(5):473-479.
- Simarro E**, Navarro F, Ruiz J, Miró E, Gómez J, Mirelis B. 2000. *Salmonella enterica* serovar Virchow with CTX-M-like beta-lactamase in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 4676-4678.
- Simoes RR**, Poirel L, Da Costa PM, Nordmann P. 2010. Seagulls and beaches as reservoirs for multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1): 110-112.
- Smith JL**, Fratamico PM, Gunther NW. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4: 134-163.
- Solá-Ginés M**, Cameron-Veas K, Badiola I, Dolz R, Majó N, Dahbi G, Viso S, Mora A, Blanco J, Piedra-Carrasco N, González-López JJ, Migura-García L. 2015. Diversity of multi-drug resistant avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) causing outbreaks of colibacillosis in broilers during 2012 in Spain. *PLoS ONE*, 10(11): e014319, 11-14.
- Sousa M**, Torres C, Barros J, Somalo S, Igrejas G, Poeta P. 2011. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) as carriers of SHV-12 and TEM-52 extended-spectrum beta-lactamases-containing *Escherichia coli* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (10): 1139-1141.
- Spurbeck RR**, Stapleton AE, Johnson JR, Walk ST, Hooton TM, Mobley HL. 2011. Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of ygi and yad fimbriae. *Infection and Immunity*, 79(12): 4753-4763

- Spurbeck RR**, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, Kim KS, Johnson JR, Mobley HLT. 2012. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infection and Immunity*, 80(12): 4115-4122.
- Swann MM**, Baxter KL, Field HI, Howie JW, Lucas IAM, Millar ELM, Murdoch JC, Parsons JH, White EG. 1969. Report of the Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO, 1969(4).
- Tausova D**, Dolejska M, Cizek A, Hanusova L, Hrusakova J, Svoboda O, Camlik G, Literak I. 2012. *Escherichia coli* with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 1103-1107.
- Teshager T**, Dominguez L, Moreno MA, Saénz Y, Zarazaga M, Torres C, Cardeñoso S. 2000. Isolation of an SHV-12  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12): 3483-3484.
- Torres C**, Zarazaga M. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit* 16(2): 109-112.
- Tóth I**, Héroult F, Beutin L, Oswald E. 2003. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4285-4291.
- Trott D**. 2013. Beta-lactam resistance in gram-negative pathogens isolated from animals. *Current pharmaceutical design*, 19(2): 239-249.
- Turrientes MC**, González-Alba JM, del Campo R, Baquero MR, Cantón R, Baquero F, Galán JC. 2014. Recombination blurs phylogenetic groups routine assignment in *Escherichia coli*: setting the record straight. *PLoS One*, 9(8): e105395, 1-12.
- Ueda S**, Ngan BTK, Huong BTM, Hirai I, Tuyen LD, Yamamoto Y. 2015. Limited transmission of *bla*<sub>CTX-M-9</sub>-type-positive *Escherichia coli* between humans and poultry in Vietnam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6): 3574-3577.
- Valentin L**, Sharp H, Hille K, Seibt U, Fischer J, Pfeifer Y, Brenner Michael G, Nickel S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Friese A, Bauerfeind R, Rösler R, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Helmuth R, Valenza G, Werner G, Schwarz S, Guerra B, Appel B, Kreienbrock L, Käsbohrer A. 2014: Subgrouping of ESBL-producing *E. coli* from animal and human sources: an approach to quantify dissemination of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology*, 304 (7): 805-616.
- Veldman K**, van Tulden P, Kant A, Testerink J, Mevius D. 2013. Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(24):7556-7561.

- Vigil PD**, Stapleton AE, Johnson JR, Hooton TM, Hodges AP, He Y, Mobley HLT. 2011. Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract. *mBio*, 2(3) e00066-11, 1-10.
- Vilarinho JF**, Chanteloup NK, Trotureau A, Baucheron S, Guabiraba R, Ecco R, Schouler C. 2016. Diversity of *Escherichia coli* strains involved in vertebral osteomyelitis and arthritis in broilers in Brazil. *BMC Veterinary Research*, 12:140.
- Vincent C**, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, Tellier PP, Tellis PA, Ziebell K, Manges AR. 2010. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1): 88-95.
- Von Salviati C**, Friese A, Roschanski N, Laube L, Guerra B, Käsbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. 2014. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in German fattening pig farms – a longitudinal study. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 127(9-10): 412–419.
- Vredenburg J**, Varela AR, Hasan B, Bertilsson S, Olsen B, Narciso-da-Rocha C, Bonnedahl J, Stedt J, Da Costa PM, Manaia CM. 2014. Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environmental Microbiology*, 16(4): 995-1004.
- Walker CLF**, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE. 2013. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *The Lancet*, 381(9875): 1405-1416.
- Wallensten A**, Hernandez J, Ardiles K, González-Acuña D, Drobni M, Olsen B.. 2011. Extended spectrum beta-lactamases detected in *Escherichia coli* from gulls in Stockholm, Sweden. *Infection Ecology & Epidemiology*, 10.3402/iee.v1i0.7030
- Weissman SJ**, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, Rogers P, Qin X, Butler-Wu S, Cookson BT, Fang FC, Scholes D, Chattopadhyay S, Sokurenko E. 2012. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5): 1353-1360.
- Wenk C**. 2000. Recent advances in animal feed additives such as metabolic modifiers, antimicrobial agents, probiotics, enzymes and highly available minerals. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 13: 86-95.
- Wieler LH**, Ewers C, Guenther S, Walther B, Lübke-Becker A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(8): 635-641.
- Wijetunge DSS**, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Kariyawasam S. 2015. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC Microbiology*, 15: 211.

**Wirth T**, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H, Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5): 1136-51.

**Yamamoto S**, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 12(2): 85-90.

**Yuan L**, Liu JH, Hu GZ, Pan YS, Liu ZM, Mo J, Wei YJ. 2009. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from chickens in Henan Province, China. *Journal of Medical Microbiology* 58(11): 1449-1453.

**Zarfel G**, Galler H, Luxner J, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Kittinger C, Grisold AJ, Pless P, Feierl G. 2014. Multiresistant bacteria isolated from chicken meat in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(12): 12582-12593.

**Zhang Y**, Laing C, Steele M, Ziebell K, Johnson R, Benson AK, Taboada E, Gannon VP. 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics*, 8: 121.

## 6.2 Bibliografía de legislación y otros documentos

**Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).** <https://www.aemps.gob.es/>

**Agencia Europea del Medicamento (EMA).** <http://www.ema.europa.eu/ema/>

**Anuario Agrario 2013 COAG.** <http://coag.chil.me/download-doc/105551>

**Codex Alimentarius.** <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-home/es/>

**European Food Safety Authority (EFSA).** <https://www.efsa.europa.eu/>

**European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC).** <https://sinaem.aged.es/ESVAC/>  
[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document\\_listing/document\\_listing\\_000302.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000302.jsp)

**Ley 29/2006**, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE núm. 178, de 27 de julio de 2006: 1-91.

**Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).** <http://www.mapama.gob.es/>

**ORDE do 21 de decembro de 2016** pola que se establecen as bases reguladoras das axudas ás entidades recoñecidas como agrupacións de defensa sanitaria gandeiras (ADSG) de Galicia e se convocan para o ano 2017-2018. DOG núm.4, de 5 de enero de 2017: 672.

**Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).** <http://www.fao.org/home/es/>

**Organización Mundial de la Salud (OMS).** <http://www.who.int/es/>

**Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).** <http://www.oie.int/es/>

**Programa Nacional** para la vigilancia y control de determinados serotipos de *Salmonella spp.* <http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS/PROGRAMAS/2015/SALMONELOSIS/>

**Real Decreto 2087/1994**, de 20 de octubre, por el que se establece las condiciones sanitarias de producción y comercialización de carnes frescas de aves de corral. BOE núm. 301, de 17 de diciembre de 1994: 37965-37986.

**Real Decreto 556/1998**, de 2 de abril, por el que se establecen las normas para expedir la certificación



de animales y productos animales exigida por la normativa veterinaria. BOE núm. 89, de 14 de abril de 1998: 12316-12318.

**Real Decreto 1888/2000**, de 22 de noviembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal aplicables a los intercambios intracomunitarios y las importaciones de aves de corral y de huevos para incubar, procedentes de países terceros. BOE núm. 306, de 22 de diciembre de 2000: 32148-32154.

**Real Decreto 3/2002**, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de las gallinas ponedoras. BOE núm. 13, de 15 de enero de 2002: 1660-1663.

**Real Decreto 328/2003**, de 14 de marzo, por el que se establece y regula el plan sanitario avícola. BOE núm. 81, de 4 de abril de 2003: 13054-13064.

**Real Decreto 1940/2004**, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos. BOE núm. 237, de 1 de octubre de 2004: 32772-32777.

**Real Decreto 2297/2004**, de 10 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 556/1998, de 2 de abril, por el que se establecen las normas para expedir la certificación de animales y productos animales exigida por la normativa veterinaria. BOE núm. 308, de 23 de diciembre de 2004: 41634-41634.

**Real Decreto 1084/2005**, de 16 de septiembre, de ordenación de la avicultura de carne. BOE núm. 233, de 29 de septiembre de 2005: 32148-32154.

**Real Decreto 692/2010**, de 20 de mayo, por el que se establecen las normas mínimas para la protección de los pollos destinados a la producción de carne y se modifica el Real Decreto 1047/1994, de 20 de mayo, relativo a las normas mínimas para la protección de terneros. BOE núm. 135, de 3 de junio de 2010: 47986-47995.

**Real Decreto 773/2011**, de 3 de junio, por el que se modifica el Real Decreto 3/2002, de 11 de enero, por el que se establecen las normas mínimas de protección de gallinas ponedoras. BOE núm. 133, de 4 de junio de 2011: 55056-55058.

**Transatlantic Task Force on Antimicrobial Resistance(TATFAR).**

<https://www.cdc.gov/drugresistance/tatfar/report.html>

**UE. 2001. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo.** Estrategia europea frente a las resistencias bacterianas. Bruselas 20/06/2001. C 333 final. [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_food-safety/docs/communication\\_amr\\_2011\\_748\\_es.pdf](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/docs/communication_amr_2011_748_es.pdf)

**UE. 2011. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo.** Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas. Bruselas, 15/11/2011. COM (2011) 748 final.



**UE. 2012.** La repercusión de la resistencia a los agentes antimicrobianos en el sector de la salud humana y en el sector veterinario - Una perspectiva de "Salud Única"- Adopción de las conclusiones del Consejo. 10347/12.  
<http://register.consilium.europa.eu/doc/srv?l=ES&f=ST%2010347%202012%20INIT>

**UE. 2015. Comunicación de la Comisión** sobre Directrices para una utilización prudente de los antimicrobianos en la medicina veterinaria. 2015/C 299/04: 7-26.

**UE. Decisión** de la Comisión **C(2010) 4684**, de 1 de julio de 2010, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo a las autorizaciones de comercialización de medicamentos y productos alimenticios que contengan quinolonas/fluoroquinolonas como sustancias activas. 1-4.

**UE. Decisión** de Ejecución de la Comisión **C(2012) 182**, de 13 de enero de 2012, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo a las autorizaciones de comercialización de medicamentos y productos alimenticios que contengan cefquinome y ceftiofur como sustancias activas. 1-3.

**UE. Decisión** de Ejecución de la Comisión **2013/652/UE**, de 12 de noviembre de 2013, sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos. L 303: 26-30.

**UE. Decisión** de Ejecución de la Comisión **C(2014) 1484**, de 28 de febrero de 2014, en el marco del artículo 35 de la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo a las autorizaciones de comercialización de medicamentos veterinarios que contengan enrofloxacin administrada a pollos y pavos en el agua de beber. 1-3.

**UE. Directiva 70/524/CEE** del Consejo, de 23 de noviembre de 1970, sobre los aditivos en la alimentación animal. L 270: 1-98.

**UE. Directiva 90/167/CEE** del Consejo, de 26 de marzo de 1990, por la que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos en la Comunidad. L 92: 42-48.

**UE. Directiva 92/117/CEE** del Consejo, de 17 de diciembre de 1992, relativa a las medidas de protección contra determinadas zoonosis y determinados agentes productores de zoonosis en animales y productos de origen animal, a fin de evitar el brote de infecciones e intoxicaciones procedentes de los alimentos. L 62: 38-48.

**UE. Directiva 97/6/CE** de la Comisión, de 30 de enero de 1997, por la que se modifica la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal. L 35: 11-13.

**UE. Directiva 2001/82/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de noviembre de 2001 por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. L 311: 1- 123.

**UE. Directiva 2003/99/CE** del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos y por la que se modifica la Decisión 90/424/CEE del Consejo y se deroga la Directiva 92/117/CEE del Consejo. L 325: 31-40.

**UE. Propuesta de Reglamento** del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a la fabricación, la comercialización y el uso de piensos medicamentosos y por el que se deroga la Directiva 90/167/CEE del Consejo.

**UE. Recomendación 2011/25/UE** de la Comisión, de 14 de enero de 2011, por la que se establecen directrices para la distinción entre materias primas para piensos, aditivos para piensos, biocidas y medicamentos veterinarios. L 11: 75-79.

**UE. Reglamento (CE) N° 1831/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. L 268: 29-43.

**UE. Reglamento (CE) N° 2160/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos. L 325: 1-15.

**UE. Reglamento (CE) N° 1177/2006** de la Comisión, de 1 de agosto de 2006, por el que se aplica el Reglamento (CE) N° 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo respecto a los

requisitos de uso de métodos específicos de control en el marco de los programas nacionales de control de la salmonela en las aves de corral. L 212: 3-5.

**UE. Reglamento (CE) N° 834/2007** del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) n° 2092/91. L 189: 1-22.

**UE. Reglamento (CE) N° 767/2009** del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de julio de 2009 sobre la comercialización y la utilización de los piensos, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1831/2003 y se derogan las Directivas 79/373/CEE del Consejo, 80/511/CEE de la Comisión, 82/471/CEE del Consejo, 83/228/CEE del Consejo, 93/74/CEE del Consejo, 93/113/CE del Consejo y 96/25/CE del Consejo y la Decisión 2004/217/CE de la Comisión. L 229: 1-28.

**UE. Reglamento (UE) N° 242/2010** de la Comisión de 19 de marzo de 2010 por el que se crea el Catálogo de materias primas para piensos. L 77: 17-32.

**UE. Reglamento (UE) N° 2016/429** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal. L 84: 1- 208.

**Unión Europea (UE).** [https://europa.eu/european-union/index\\_e](https://europa.eu/european-union/index_e)





